

Çiğ Sütte *Pseudomonas aeruginosa* Sayılması için Yöntem Modifikasyonları Üzerine Çalışmalar¹

Aylin Şen², A. Kadir Halkman³

Giriş

Pseudomonas cinsi bakteriler, Pseudomonadaceae familyası içerisinde yer alırlar. Bu bakterilerin çoğu doğada toprak ve sularda yoğun olarak bulunur. Bazı türleri insan, hayvan ve bitki patojenidir. Son derece önemli olan bu cinsin türlerinin bazıları oksidaz pozitif, bazıları oksidaz negatiftir. Glikozu oksidasyon yoluyla parçalayan fakat fermantasyon yapmayan 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 gelişebilmeleri sonucu okside ürünler ve mukoz madde oluştururlar. Kendi gelişmeleri için gerekli gelişme faktörleri ve vitaminleri sentezleme yeteneğindedirler. Psikrofil, mezofil veya psikrotrof türleri vardır.

Özellikle soğukta saklanan süt, et, yumurta ve deniz ürünlerinin birinci derecede bozulma etmenidirler. Isı ve radyasyonla kolaylıkla inhibe olabilmektedirler. Oksijen olmadığı zaman ve 42 °C'nin üzerinde üreyemezler. Kurumaya dirençlilikleri zayıftır. Bazı gıdalar üzerinde *Pseudomonas fluorescens* yeşilimsi, *Pseudomonas nigricans* siyah diğer türleri ise kahverengi pigment oluştururlar (1, 2, 3).

Bu cinsin üyeleri birçok antibiyotiğe karşı dirençli olduklarından ve ancak birkaç bakterinin tolere edebildiği koşullarda canlılıklarını sürdürebilmeleri nedeni ile klinik açıdan önemlidirler (4).

Değişik kaynaklar, süte karışan *Pseudomonas* 'ların sütte hızla çoğalıp, çeşitli fermantasyonlara, parçalanmalara neden olduğunu ve bu faaliyetler sonucunda sütün renginde kokusunda, yapı ve kıvamında birçok değişiklikler olduğunu göstermektedir. Sütte *Pseudomonas* 'lar sütün tazeliğini bozduğu gibi bazen de çeşitli enfeksiyonlara neden olmaktadır. Özellikle fırsatçı patojen olarak bilinen *Pseudomonas aeruginosa* sütün çok fazla tüketildiği 0-3 yaş grubu çocuklarda süt kaplarının temizliğine dikkat edilmediğinde bulaşarak hastalıklara ve salgınlara yol açmaktadır.

¹ Yüksek Lisans seminerinden derlenmiştir.

² Gıda Mühendisi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı Yüksek Lisans Öğrencisi, Dışkapı Ankara aylinsen61@yahoo.com

³ Prof. Dr., Ankara Üniv. Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü, Dışkapı Ankara.

Pseudomonas 'ların türleri oldukça fazla olduğu için görünümüne, pigment oluşturup oluşturmamalarına ve metabolizmalarına göre sınıflandırmaları yapılmıştır. RNA/DNA hibridizasyon deneylerine göre, bu iki nükleik asidin gösterdiği uyumlara bakarak, bu bakteriler I, II, II, IV, V rRNA gruplarına ayrılmışlardır. *Pseudomonas aeruginosa* rRNA grup I'e dahil olmuştur (5).

***Pseudomonas aeruginosa* 'nın Özellikleri**

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 (6).

Morfolojik Özellikleri

Uzunlukları çok değişik olmakla beraber *Pseudomonas 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 (5, 7, 8).

Kültürel ve Biyokimyasal Özellikleri

Pseudomonas 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.

P. aeruginosa katı besiyerlerinde 3 tip koloni oluştururlar. Tip 1 koloni, 2-3 mm çapında yuvarlak, mat yüzeyli, ortası kabarık, yassı, beyaz renkli karşidan 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 *Pseudomonas aeruginosa* 'nın bazı suşlarının hücre dışı alginat salgılaması nedeniyle mukoid görünümde bakterinin oluşturduğu R kolonileridir. Kültürlerde triptofan 2-aminoasetofenon üretimine bağlı olarak karakteristik bir meyve kokusu vardır ve petri kutusunun kapağı açıldığında üzüm kokusu veya trimetilamin kokusu şeklinde hissedilir (6, 7, 9, 10).

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 pozitifdir.
- L-arjinin dihidrolaz oluştururken, lisin dekarboksilaz ve ornitin dekarboksilaz oluşturmazlar.
- İndol ve H₂S oluşturmazlar.
- 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 (4, 5, 8, 9, 10).

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 (6, 7).

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. Fluoressein, 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 (6, 10).

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 (6, 10).

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 (6, 10).

Piyomelanin, *P. aeruginosa* tarafından üretilen kahverengi, siyah renkte sık gözlenmeyen bir pigmenttir (6).

Besiyerinde özellikle piyosiyenin ve flouressein pigmentlerinin oluşumu *Pseudomonas aeruginosa* 'nın tanısı yönünden oldukça önemli bir özelliktir (9).

Pseudomonas aeruginosa suşları bakteriyosinler 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 bakteriyosinleri 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 denenir.

Pseudomonas aeruginosa 'larda birçok litik fajlar identifiye edilmiştir 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.

Pseudomonas 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 (9).

Çeşitli Ajanlara Karşı Dirençlilik

Pseudomonaslar 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, heksoklorofenli sabunlarda, iyotlu solüsyonlar içinde bile üreyebilirler, hatta dörtlü amonyum bileşiklerini besin kaynağı olarak kullanabilirler.

Fenoller ve glutaraldehit genellikle *Pseudomonas* 'lara etkili olan dezenfektanlardır (2, 6).

Pseudomonas 'lar, özelliklerde *P. aeruginosa* yaygın olarak kullanılan antimikrobiyel etkenlerin çoğuna dirençlidir. Genellikle aminoglikozitlere duyarlıdırlar (11).

Pseudomonas suşların antimikrobiyel ajanlara duyarlılığı üzerine yapılan bir çalışmada, izole edilen *P. aeruginosa* suşlarına karşı Sceptor *Pseudomonas/Resistant* MIC/ID Panelinde saptanan antibiyotik duyarlılık testi sonucunda trimeth/sulfa 1/19, aztreonan, ceftriaxone, cefazolin, ampicillin/clavulan, ampicillin, ampicillin/sulbactam, cefotetan, tetracycline, nitrofurantoin, trimethoprim, sulfisoxazole'e % 100 oranıyla en dirençli mikrobiyal ajanlar olarak saptanmıştır. Hassasiyet durumları araştırılan diğer mikrobiyel ajanlar ise *P. aeruginosa* suşlarına karşı % 93,50 ile % 9,38 arasında dirençli bulunmuştur. Ayrıca bu çalışmada ciprofloksacin % 81,25, imipenem % 86,20, amikacin % 71,88, ticarcillin/clavutan % 68,85 oranıyla en etkili mikrobiyel ajanlar olarak saptanmıştır. Hassasiyet durumları araştırılan diğer mikrobiyel ajanlar ise *P. aeruginosa* suşlarına karşı % 57,81 ile % 6,15 arasında etkili bulunmuştur (12).

P. aeruginosa suşlarının Sceptor *Pseudomonas/Resistant* MIC/ID Panelinde saptanan bazı antibiyotiklere karşı duyarlılık durumları Çizelge 1' de verilmiştir.

Yaptığı Hastalıklar

Pseudomonas 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 bronkopneumoni, septisemi, osteomyelit, psödomembranöz kolit gibi hastalıklardan izole edilebilirler (2, 4, 8).

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 edebilir.

P. aeruginosa 'nın 1946 yılında yapılan bir araştırmaya göre sütle alınması sonucu, akut epidermik gastroenteritidise sebep olduğu bildirilmiştir. Diyare, kramp, bulantı ve kusma semptomlarıyla seyreden 409 olaya görülmüştür. Semptomlarının bebek ve çocuklarda daha şiddetli olduğu ve bebeklerde 9 ölüm meydana geldiği bildirilmiştir. *P. aeruginosa* 'nın 10^6 dozunda ağızdan alımının gastroenteritidis sebebi olabileceği bildirilmiştir (5).

Çiğ Sütte *Pseudomonas Aeruginosa* 'nın Varlığı ve Önemi

Sütte mikroorganizma kontaminasyonları süt üretimi sırasındaki koşullara bağlıdır. Sütün sağım yapılan çiftliklerde uzun süre düşük sıcaklıklarda bekletilmesi veya soğutulması, işletmelere getirilen tankların temizliği ve sıcaklığı sütün bakteriyolojik özelliklerini belirler (13).

Çizelge 1. *P. aeruginosa* suşlarının çeşitli antibiyotiklere duyarlılıkları (12).

Sayı	ANTİBİYOTİK	N	Duyarlı		Dirençli		Orta Duyarlı	
			Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%
1	İmipenem	58	50	86,2	8	13,79	-	-
2	Ciprofloxacın	64	52	81,25	12	18,75	-	-
3	Amikacin	64	46	71,88	6	9,39	12	18,75
4	Ticarcilin/clavulanant	61	42	68,85	16	26,22	3	4,91
5	Topramycin	64	37	60,34	24	37,5	3	4,69
6	Ticarcillin	58	35	57,81	23	39,66	-	-
7	Ceftazidime	56	31	55,36	20	35,71	5	8,93
8	Norfloxacin	6	3	50	3	50	-	-
9	Gentamycin	64	31	48,43	29	45,31	4	6,25
10	Cefoperazorne	55	26	47,58	21	38,18	8	14,54
11	Piperacillin	58	4	6,9	54	93,1	-	-
12	Cefotaxime	65	4	6,15	34	52,3	27	41,53
13	Trimeth/sulfa 1/19	65	-	-	65	100	-	-
14	Aztreonam	58	-	-	58	100	-	-
15	Ceftriaxone	55	-	-	55	100	-	-
16	Cefalotin	36	-	-	36	100	-	-
17	Cefuroxime	35	-	-	35	100	-	-
18	Amoxicillin/clavulant	35	-	-	35	100	-	-
19	Ampicillin	33	-	-	33	100	-	-
20	Ampicillin/sulbactam	31	-	-	31	100	-	-
21	Cefotetan	25	-	-	25	100	-	-
22	Tetracycline	13	-	-	13	100	-	-
23	Nitrofurantoin	6	-	-	6	100	-	-
24	Trimethoprin	6	-	-	6	100	-	-
25	Sulfisoxazole	5	-	-	5	100	-	-
26	Ceftizoxime	3	-	-	1	33,33	2	66,66

n: Testte kullanılan suş sayısı

Pseudomonas 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 ekipmanları ve hortum başlarında kolonizasyon yapabilmektedirler. İyot bazlı dezenfektanların düşük seviyelerde kullanılması gibi durumlarda *Pseudomonas* 'lar yapışkan bir madde olan glyoksal üretirler. Bu madde sayesinde organizma, yüzeye daha iyi tutunarak ekipman yüzeylerinde kolonizasyon oluşturabilmekte ve antimikrobiyel ajanlara, fagositlere ve surfektanlara dirençlerini arttırmaktadır. Su ve hortumdan kontamine olmuş *Pseudomonas* 'ların eliminasyonu bakterinin direnç mekanizmasının güçlü olmasından dolayı oldukça zordur (14, 15).

Soğukta bekletilen sütlerde, *Pseudomonas* grubu bakterilerin salgıladıkları ısıya son derece dirençli esteraz (proteaz-lipaz) gibi enzimlerin varlığı ve bu enzimlerin süt ürünlerinde pastörizasyon sonrası tekrar aktif hale geçmesi ürün bazında sorunlar yaratmaktadır.

Örneğin süt, peynir, krema ve tereyağında trigliseritlerin parçalanması sonucu acılaşıma meydana gelmektedir. Bu enzimler UHT sütte asitlik gelişmeksizin tatlı pıhtılaşıma denilen enzimatik bir hataya neden olmakta ve proteinleri parçalayarak kabın dibinde sediment oluşturmaktadır (16, 17).

Türkiye 'de üretilen çiğ sütün 10-11 milyon ton/yıl olduğu, bunun %18-20 kadarının sanayiden geçtiği, UHT süt üretiminin ise 500 milyon litre/yıl olduğu tahmin edilmektedir. Proteaz enzimleri UHT 'ye işleme sırasında stabilitelelerini korumakta, enzim miktarı ve aktivitesine bağlı olarak zaman içinde UHT sütte pıhtılaşmaya neden olmaktadır. Proteaz enzimleri esas olarak *Pseudomonas aeruginosa* ve *Bacillus cereus* tarafından oluşturulmaktadır. Bu enzimin kantitatif tayini üzerinde ciddi çalışmalar yapılmakla beraber, bu konu üzerinde henüz tatmin edici sonuçlar alınamamıştır. *Pseudomonas aeruginosa* sayılmasına bağlı olarak sütte olası proteaz enzim varlığının tahmini buna göre bu sütün UHT süte verilip verilmeyeceğine karar verilmesi ise mikrobiyolojik analizlerin en az 24 saat sürdüğü dikkate alındığında pratik bir anlam taşımamaktadır (4, 14, 18, 19).

Türkiye'nin kırsal yapısı dikkate alındığında sütün çiftliklerden ziyade köylülerden alındığını açıkça ortaya koymaktadır. Bu aşamada proteaz enzimi varlığı değil ama, bu enzimi 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.

***Pseudomonas Aeruginosa* Sayımına Yönelik Yapılan Çalışmalar ve Kullanılan Besiyerleri**

Pseudomonas aeruginosa çeşitli gıda örneklerinde sayımı için GSP Agar ve Cetrimide Agar besiyerleri önerilmekle beraber, sanayiden gelen veriler bu besiyerlerinin *Pseudomonas* için selektivitesinin yeterli olmadığı yönündedir. *Pseudomonas* 'ların ve çiğ sütteki refakatçi floranın antibiyotik direnci ve diğer biyokimyasal özellikleri dikkate alınarak, mevcut besiyerleri üzerinde çeşitli modifikasyonlar yapılarak daha selektif besiyeri elde edebilmek için çeşitli çalışmalar yapılmaktadır.

Pseudomonas 'ların gıdalarda bozulmalara neden 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 tarafından *Pseudomonas* 'ların izolasyon ve sayımına 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 antibiyotikler floresans veren *Pseudomonas* 'ların gelişimini engellemektedirler (20).

Pseudomonas F agar ve *Pseudomonas* P agar, King ve arkadaşları tarafından geliştirilen *pseudomonas*ların ayırımında pigment oluşumunda yararlanılan King A ve King B besiyerlerinin modifikasyonlarıdır.

Pseudomonas F agar içerisinde yer alan peptonlardaki fosfor floresens üretimini teşvik eder. Dipotasyum fosfat besiyeri içerisindeki fosfor içeriğini artırır. Magnezyum sülfat floresens üretimi için gerekli olan iyonları sağlar. *Pseudomonas* P agar içerisinde yer alan jelatin peptonu amino asit ve diğer esensiyel azot kaynaklarını oluşturur. Jelatin pepton fosfor açısından zayıftır. Bu da piyosiyanın oluşumunda inhibe edici etki gösterir. Mg^{++} , K^+ ve SO_4^{-2} iyonları piyosiyanın üretimini artırır.

Mead ve Adams 1977'de, ALCV (Asetamid, laktoz, kristal viole), MGV (malaşit green vankomisin), diamid içeren heart infusion agar ve CETCH (Cetrimid, cephaloridin) ortamlarının hangisinin seçici olduğunu araştırmışlar ve sonuçta ALCV, MGV ve CETCH ortamlarının her üçünün de aşıl原因an 12 saf *Pseudomonas* sp. kültürünü tavuklardan geri almada eşit ölçüde başarılı olduğunu saptamışlardır. Heart infusion agarı ise mayaların gelişimini desteklemesi ve pigment oluşturmayan *Pseudomonas* sp. kolonilerini inhibe etmesinden dolayı en az başarılı olarak değerlendirilmiştir. Mead ve Adams 1977 yılında heart infusion agara seçici ajan olarak cephaloridine, fucidin ve cetrimide ilavesiyle geliştirdikleri yeni ortamda 25 °C'de 48 saat inkübasyon sonunda *Pseudomonas* sp.'ler Petri kutularında 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 (20).

Goto ve Enomoto *Pseudomonas* bazal besiyerine 15 µg/ml nalidiksik asit ilavesiyle ve aynı zamanda cetrimid miktarının 200 µg'a çıkarılmasıyla *Pseudomonas* CN besiyerini geliştirmişlerdir ve besiyerinin performansının arttığını göstermişlerdir. Bu besiyeri pigment oluşumunu desteklerken *Klebsiella*, *Proteus* ve *Providencia* gibi bakterilerin gelişimini baskılamaktadır (21).

Mead ve Adams cetrimid miktarını 10µg/ml'ye yükselterek pigment oluşturan ve oluşturmayan tüm psikrofil bakterilerin geliştiğini göstermişlerdir. Besiyerinin selektivitesini arttırmak için ortama 50 µg/ml cephaloridine ve 10 µg/ml fucidin ilave etmişlerdir. Bu kombinasyon (*Pseudomonas* CFC agar) *Pseudomonas*ların gıdalardan izolasyonunda daha spesifik bir ortam oluşturmuştur (21).

Stanbridge ve Board CFC besiyerinde *Pseudomonas* 'ları enterobakterlerden ayırabilmek için modifikasyon yapmışlar, besiyerine %1 oranında arjinin ve % 0,002 fenol red ilave etmişlerdir. *Pseudomonas*ların arjininden amonyak oluşturması sonucu renk pembe olmakta ve bu şekilde koloniler ayrılabilir (21).

Macaristan'da tanklardan toplanan soğutulmuş çiğ sütlerde *Pseudomonas* türleri araştırılmıştır. Bu çalışmada Z broht, nitrofurantoin broth ve cetrimide besiyerlerindeki üreme durumları değerlendirilmiştir. Z broth ve nitrofurantoin broth da *P. aeruginosa* 'nın ürettiği, *P. putrefaciens*, *P. putida*, *P. cepacia*, *P. acidovorans*, *P. testosteroni*, *P. maltophilia* ve *P. diminuta* 'nın üreme göstermediği saptanmıştır (22).

Aynı araştırmacılar tarafından yapılan çalışmada *Pseudomonas aeruginosa* 'nın selektif izolasyonunu için hem sıvı (Z-broth) hem de katı (Z-agar) besiyeri geliştirilmiştir. Çalışmada Z broht ile nitrofurantoin broth ve Z agar ile cetrimide agar besiyerlerindeki üreme durumları karşılaştırılmıştır.

Hazırlanan bu ortamlara engelleyici bir madde ilave etmemişler ve ortama katılan asetamidin, nitrojen ve karbon kaynakları sayesinde asetik asit ve amonyağa metabolize olduğu saptanmıştır. Asetamid *Pseudomonas* 'ın diğer türlerinden *P. cepacia*, *P. acidovaranc*, *P. putida* tarafından metabolize edilebilse de bu türlerin nitratı indirgeme yetenekleri yoktur. Z broth 'un seçiciliğini test etmek için *Staphylococcus*, *Enterobacteriaceae*, *Bacillus* ve *Pseudomonas* gruplarına ait saf kültürlerin inoküle edildiği bu ortam farklı sayılardaki *Pseudomonas aeruginosa* ile inoküle edilen iki süt örneği ile karşılaştırılmıştır. Birinci örnek 10^3 /ml *P. aeruginosa*, ikinci örnek ise 10^5 /ml *P. aeruginosa* içerdiği bildirilmiştir. İkinci örnekle yapılan test sonucuna göre Z agar ve ceftrimide agar arasında önemli bir mikrobiyolojik ayırım bulunmazken birinci örnekte Z agarın önemli bir ayrıcalık gösterdiği bulunmuştur. Z broth ve nitrofurantion broth birlikte kıyaslandığında ise iki ortamın da *P. aeruginosa* 'nın gelişimine izin verdiği görülmüştür. Diğer *Pseudomonas* türlerinin ise gelişemediği görülmüştür (22).

Kristiansen 1983 yılında çiğ sütlerde yaptığı çalışmada *Pseudomonas* CN (Ceftrimid, nalidiksik asit) ve *Pseudomonas* CFC (cephaloridin fucidin ceftrimid) besiyerini kullanmıştır. Çiğ süt örneklerine bu besiyerlerinde 25-30 °C'de 24 saat inkübasyon uygulanmıştır. *Pseudomonas* CN ve *Pseudomonas* CFC besiyerinde *P. aeruginosa*, *P. putida*, *P. fluorescens*, *P. cepecia* 'nın üreme gösterdiği saptanmıştır (23).

Mickova ve arkadaşları tarafında 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 ceftrimide agar kullanılmıştır (24).

P. aeruginosa klorlamadan zarar görmektedir. Bu nedenle yüzme havuzu sularında *P. aeruginosa* izolasyonunda ABGP (Arginin Brilliant Green Glukoz Pepton) sıvı besiyeri geliştirilmiştir. Bu ortamda arjinin bulunmaktadır ve *P. aeruginosa* 'nın etkisiyle ortamın rengi gri yeşilden mavi menekşeye dönüşmektedir. Bu yöntemde ya membran filtrasyon tekniği ya da direkt sıvı zenginleştirme yöntemi kullanılmıştır. 37 °C'de 48 saat inkübasyonun ortamın rengindeki değişimi görmek için yeterli olduğu saptanmıştır. Daha uzun sürelerde inkübasyonun yanlış sonuca götürdüğü görülmüştür (24).

Levin ve Cabelli *Pseudomonas aeruginosa* için selektif membran filtrasyon agar olan M-PA agarı tasarlamışlardır. Besiyeri formülasyonuna kanamycin, nalidixic asit, sulfapyridine ve cycloheximide antibiyotikleri ilave edilerek daha selektif bir besiyeri elde edilmiştir. Bu orijinal formülasyonda yer alan bileşiklerin konsantrasyonları ya da bileşimi değiştirilerek modifiye bir besiyeri olan M-*Pseudomonas aeruginosa*-B agar geliştirilmiştir. Daha sonra Brodsky ve Ciebin bu besiyerinden sulfapyridine ve cycloheximide antibiyotiklerini çıkartarak M-*Pseudomonas aeruginosa*-C agarı geliştirmişlerdir (25).

Bharath ve arkadaşları *Pseudomonas aeruginosa* 'nın sulardan izolasyonunda ve sayımında MacConkey agar kullanmışlardır (26).

Pseudomonas aeruginosa izolasyonunda çoğunlukla kullanılan ortamlar çizelge 2' de verilmiştir (24).

Çizelge 2. *Pseudomonas aeruginosa* izolasyonunda kullanılan ortamlar

Ortamın Adı	Mekanizması	Etkili Maddeler	Hassaslık/ Özgünlük
King A	Mavi renkli piyosyanin oluşumu		Seçici değil, hassaslık var, özgünlük var
King B	Sarı renkli piyoverdin oluşumu		Seçici değil, hassaslık var, özgünlük yok
Pseudomonas F agar (flo agar)	Kazein kullanımı, fosforlar tarafından fluorescein üretimi artar.	Kazein peptonu, Fosfor, MgSO ₄ , Gliserol	Düşük hassaslık
Pseudomonas P agar (tech agar)	Mg ⁺⁺ ve gliserol piyosyanin pigment oluşumunu kuvvetlendirir. (UV)	Jelatin peptonu Mg ⁺⁺ , K ⁺ , SO ₄ ⁺⁺ , Gliserol	Düşük hassaslık
Cetrimide agar	Kuaterner amonyum deterjanları diğer türleri inhibe eder.	Cetiltrimethyl-ammonium Bromide	
Pseudomonas CN agar	Cetrimidin deaminasyonu ile NH ₄ oluşumu	Cetrimide Nalidiksik asit	Hatalı sonuçlar olabilir. Yalnızca doğrulayıcı test olarak kullanılır.
Pseudomonas CFC agar		Cetrimide cephaloridine fucidin	
Asetamid agar	Asetamidin deaminasyonu ile NH ₄ oluşumu	Asetamid	
Asparajin broth	Büyümeyi destekleyici olarak asparajin kullanımı	Asparajin	Yalnızca eleme testi
MacConkey agar			Seçici değil, hassaslık şüpheli, fluoresansa karşı özgün
Malaşit green broth	Boya tarafından diğer türlerin inhibisyonu	Malaşit green	Düşük özgünlük, zayıf eleme testi
m- <i>Pseudomonas aeruginosa</i> agar m-PA-B m-PA-C	Lisin deaminasyonu, sitrat ve ksilozun kullanımı	Antibiyotikler -kanamycin -cycloheximide -nalidixic asit -sulfapyridine	Fermantatif mikroorganizmalardan dolayı hatalı negatifler olabilir. Kuvvetli seçici, hassaslık ve özgünlük yok
Pseudomonas izolasyon agar		Irgasan (triclosan)	Bütün <i>Pseudomonas</i> spp.'lere seçici, özgünlük ve hassasiyet var
C-390 agar	<i>P. aeruginosa</i> olmayanları antimikrobiyeller inhibe eder	c-390 antimikrobiyel	Düşük hassasiyet gösteren tipik kolonilerin gösterimine gerek var
Skim milk agar	Proteinlerin deaminasyonu	Antimikrobiyel madde yok. 42 °C'de inküb.	Düşük hassaslık ve özgünlük
Warburton ortamı	<i>P. aeruginosa</i> olmayanları antimikrobiyeller inhibe eder	Antimikrobiyel karışım	Bütünüyle test edilmedi

Kaynaklar

1. Ayhan, K. 2000. Gıdalarda Bulunan Mikroorganizmalar Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü yayını 37-81. Sim Matbaacılık Ltd. Ankara.
2. Tortora, J. G., Funke R. B. and Case L. C., 1992. Microbiology 169, 277, 523 s. The Benjamin/Cummings Publishing Company Inc., California.
3. Pelczar, J. M and Reid D. R., 1958. Microbiology 125 s. Kogakusha Company Ltd. Tokyo.
4. Merck Gıda Mikrobiyolojisi. 2004. Web sitesi. www.mikrobiyoloji.org. Erişim tarihi: 12.11.2004.
5. Özcan, M., 1996. Ankara garnizonundaki askeri birliklerin içme sularında membran filtrasyon tekniği ile *Pseudomonas aeruginosa* 'nın izolasyonu ve identifikasyonu üzerine araştırmalar. A.Ü. Sağlık Bil. Ens. Bilim Uzmanlığı (Yüksek Lisans) Tezi, Ankara.
6. Aydın, F., 2001. Çeşitli klinik örneklerden izole edilen *Pseudomonas aeruginosa* suşlarının değişik yöntemlerle çeşitli antimikrobiallere duyarlılıklarının araştırılması. A.Ü. Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Ana Bilim Dalı Uzmanlık Tezi, Ankara.
7. Davis, D. B., Dulbecco, R., Eisen, H., Ginsberg, H. S. and Wood, W. B. 1968. Microbiology. 756-757., 774 s. Hober Medical Division, New York.
8. Frobisher, M. 1968. Fundamentals of Microbiology. 457 s. W. B. Saunders Company, USA.
9. Ilgaz, A., 1999. Özel Mikrobiyoloji Medison Yayınları 91-96. Ankara.
10. Wilson, S. G. and Miles, A. A. 1964. Principles of Bacteriology and Immunity. 636-643. Edward Arnold (Publishers) Ltd. London.
11. Koçoğlu, F., 1994. Sivas yöresinde çeşitli örneklerden izole edilen *Pseudomonas* türleri ve bunların bazı antimikrobiallere in-vitro duyarlılıkları. Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Ana Bilim Dalı Uzmanlık Tezi, Sivas.
12. Yılmaz, S. 1999. Çeşitli klinik örneklerden izole edilen *Pseudomonas aeruginosa* suşlarının antimikrobiyel ajanlara duyarlılığı. Yüzüncü Yıl Üniversitesi Sağlık Bil. Ens. Yüksek Lisans Tezi, Van.
13. Rowe, M. and Gilmour, A., 1985. The present and future importance of psychrotrophic bacteria. Dairy industries international. 50:14-29.
14. Dinsmore, R.P., Meyer, S., Garry, F. and Hirst, H. 2004. Sources of *Pseudomonas* spp. in Bulk Tank Milk on Colorado Dairy Farms <http://www.nmconline.org/articles/pseudsources.htm>
15. Metin, M., 2001. Süt teknolojisi Sütün bileşimi ve işlenmesi E.Ü. Mühendislik Fakültesi Yayınları 374-380. Ege Üniversitesi basım evi, İzmir.
16. Cousins, C.M. and Bramley, A.J., 1983. The microbiology of raw milk Dairy microbiology. 1: 119-164.
17. Bigalke, D., 1985. Dairy quality dairy and food sanitation, Oct. 388-389.
18. Ralyea, RD, Wiedmann, M. and Boor KJ. 2004. Bacterial tracking in a dairy production system using phenotypic and ribotyping methods. J Food Prot. 1998 Oct;61(10):1336-40.
19. 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.

20. Jeppesen, C.,1995. Media for *Aeromonas* spp., *Plesiomonas shigelloides* and *Pseudomonas* spp from food and environment. International Journal of Food Microbiology, 26: 25-41.
21. Oxoid limited 2004. Web sitesi. www.oxoid.com. Erişim tarihi: 10.12.2004.
22. Szita,G.,1998.A novel selective synthetic selective culture medium for *Pseudomonas aeruginosa*. Acta Veterinaria Hungarica, 38(3): 187-194.
23. Kristiansen, A.K., 1983. Evaluation of two selective media for rapid isolation of Pseudomonas strains. Danks veterianertid skrift. 66(3): 83-91.
24. Keskin, D. ve Ekmekçi, S., 2003. Orlab on-line mikrobiyoloji dergisi. *Pseudomonas* türlerinin gıdalardan izolasyon ve tanımlanmasında kullanılan besiyerleri. Cilt:01, Sayı:08 29-33. www.mikrobiyoloji.org/pdf/702030803.pdf
25. Anonymous 1998. Difko Manual. M-PA-C Agar, Pseudomonas Agars. 418-419, 462-463. USA.
26. Bharath, J., Masodeen, M., Motilal, S., Sandy, S., Sharma, S., Tessaro, K., Thomas, K., Umamaheswaran, M., Simeon, D. and Adesiyun,A.A., 2002. Microbialquality of domestic and imported brands of bottled water in trinidad. International Journal of Food Microbiology. 81: 53-62.