

***Pseudomonas aeruginosa*'nın DİRENÇLİ OLDUĞU DEZENFEKTANLARIN SAPTANMASI¹**

Dilek KESKİN²

Sanver EKMEKÇİ³

ÖZET

Bu çalışmada *P. aeruginosa*'nın dirençli olduğu dezenfektanların saptanması amaçlanmıştır. Bu amaçla TS EN 1276:1997 yöntemi kullanılmıştır. Deneme organizması olarak *P. aeruginosa* ATCC 27853, *Esherichia coli* ATCC 29998, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 P kullanılmıştır. Kullanılan dezenfektanlar ise; kuaterner amonyum bileşikleri, klorhegzidinglukonat, sodyum hipoklorürdür. *P.aeruginosa*'yı diğer bakterilerle kıyasladığımızda kuaterner amonyum bileşikleri ve klorhegzidinglukonata karşı dirençli olduğu bulunmuştur.

Anahtar Sözcükler: *P. aeruginosa*, *E. coli.*, *S. aureus*, klorhegzidinglukonat, sodyum hipoklorür, kuaterner amonyum bileşikleri.

DETERMINATION OF DISINFECTANTS RESISTANT TO *P.aeruginosa*

ABSTRACT

In this study, it has been aimed that disinfectants *P. aeruginosa* resistant to TS EN 1276:1997 has been used for this aim *P. aeruginosa* ATCC 27853, *E. coli* ATCC 29998, *S. aureus* ATCC 6538 P are used for as a test organisms. Tested disinfectants are also quaternary ammonium compounds, chlorhexidine gluconate, sodium hypochloride *P. aeruginosa* was found to be resistant against quaternary ammonium compounds and chlorhexidine gluconate compared to other bacteria.

Key words: : *P. aeruginosa*, *E. coli*, *S. aureus*, quaternary ammonium compounds, chlorhexidine gluconate, sodium hypochloride

¹ Bu çalışma Dilek KESKİN'in doktora tezinden alınmıştır.

² ADÜ Çine Meslek Yüksekokulu Süleyman Pekgüzel Kampüsü Çine-AYDIN

³ Ege Üniversitesi, Biyoloji Bölümü, TEM Anabilim dalı Bornova-İZMİR

GİRİŞ

Pseudomonaceae familyası içinde yer alan ve fırsatçı türleri de içerebilen *Pseudomonas* cinsi bakteriler gram negatif, çubuk şeklinde polar flagella ile hareket eden ve son elektron alıcısı oksijen olan, zorunlu aeroblardır. Oksidaz ve katalaz pozitif olan bu bakteriler floresans ve floresans olmayan çeşitli pigmentler üretirler. Birçoğu doğada, toprakta ve sulara yaygın bulunan *Pseudomonas* türlerinin bazıları bitkiler veya hayvanlar içinde patojendirler. *Pseudomonas*'lar ısıya dirençli değildirler ve 55°C'de bir saatlik ısı uygulanması büyük bir kısmını tahrip etmektedir. Penisilline karşı dirençlidirler. Ayrıca dezenfektanlara da dirençlidirler (Nickerson and Sinskey,1977). Hayvan patojenlerinden en önemlileri *P. aeruginosa*, *P. pseudomallei* ve *P.mallei*'dir. Bitki patojenlerinden en önemlileri ise *P. solanacearum*, *P. syringae*, *P. marginalis* ve *P. cepacia*'dir (Bilgehan,2000).

Pseudomonas'lar cinsi psikrofil olmaları nedeniyle buzdolabında saklanan ürünlerin bozulmasına neden olmaktadır. *Pseudomonas*'ların bazıları 0°C'ye yakın sıcaklıklarda, bazıları ise 0°C'nin altındaki sıcaklıklarda gelişmektedirler.

MATERYAL

Dezenfektanlar

Denemelerde kullanılan dezenfektanlardan kuaterner amonyum bileşikler (%3) biguamed Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Hijyen ve Sanitasyon biriminden klorhegzidin glukonat (%2 klorhegzidin glukonat +%15 setrimid) (ticari ismi Salvon) ve sodyum hipoklorür (%3) ticari satış noktalarından temin edilmiştir.

Test Organizmaları

Denemelerde *P. aeruginosa* ATCC 27853, *E.coli* ATCC 29998, *S.aureus* ATCC 6538 P test organizması olarak kullanılmıştır. Bu suşlar Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji anabilim dalından temin edilmiştir. Bunun yanı sıra yağ ve protein yönünden zengin gıdalar olan etten ve süten *P.aeruginosa* izole edilmiştir.

YÖNTEM

Dezenfektanların Etkisi

Denemeler TS:1276:1997'ye göre yapılmıştır. Deney sonunda dezenfektanın organizmaların ne kadarını öldürdüğünü saptamak için % 0,85'lik fizyolojik su ile 10⁴e kadar yapılan seyreltmelerden dökme plaka yöntemine göre çift paralelli olarak ekim yapılmış ve üzerine 45 °C'ye soğutulmuş Triptik Soy Agar döküldükten sonra ve petriyer 37°C'de 24-48 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonucu petriyerde oluşan koloniler sayılmıştır (TS: 1276:1997).

Etden ve Süten *P.aeruginosa* İzolasyonu

10 gr/ml et yada süt örneğinin %1'lik peptonlu suda seyreltmesi yapıldıktan sonra dökme plaka yöntemine göre ekimi yapılmıştır. İzolatların seçiminde ise *Pseudomonas* CF agar (SR 102)'de 30°C'de 24-48 saat inkübasyon sonucunda beyaz, sarı ve yeşil pigment veren şüpheli kolonilerden EMB agara ekim yapılmıştır. 30°C'de 48 saat inkübasyon sonucunda renksiz olan koloniler laktoz negatif, mavi-siyah ve yeşilimsi parlak koyu koloniler laktoz pozitifdir. Bunlardan laktoz negatif olanlarla çalışmaya devam edilmiştir ve bu kolonilere Oksidasyon-Fermentasyon (O/F glukoz) testi yapılmıştır. *Pseudomonas*'lar oksidatif (O) reaksiyon vermektedir. Aynı örneklere katalaz, oksidaz ve hareket testi yapılmıştır. Katalaz (+), hareket (+), oksidaz (+) olan tipik izolatlarla çalışmaya devam edilmiştir. Ayrıca 42°C'de üreme ve piyosyanin pigmentini oluşturma özelliğine bakılmıştır (Uraz ve Çıtak,1998; TS:13720).

SONUÇLAR VE TARTIŞMA

P.aeruginosa ve Test Organizmalarına Karşı Sodyum Hipoklorürün Etkisi

Klor içeren dezenfektanların başında sıvı klor, inorganik klor bileşikler (hipokloritler) ile organik klor bileşikler (kloroforlar, kloraminler) gelmektedir. Bunlar su ile reaksiyona

girince hipokloros asit (HOCl) ve HCl oluşur. HOCl bakteri hücrelerine nüfuz eder ve hücrenin bazı komponentleriyle reaksiyona girerek oksidasyona neden olur. Aktif klor bileşikleri bakterilere, mantarlara virüslere, yüksek konsantrasyonda ise küflere ve sporlara da etkilidir (Şanlı,1999; Özenli,1988; Akyer,2002).

Çizelge 1’de sodyum hipoklorürün *P.aeruginosa* ve test organizmalarına karşı etkisi verilmiştir.

Çizelge 1. Sodyum Hipoklorür’ün *P. aeruginosa*, *E. coli*, *S. aureus* ve İzole edilen *P. aeruginosa* Türlerine Karşı etkinliği

Organizma adı	Başlangıç bakteri sayısı Log ₁₀ kob/ml	Konsantrasyon	Deney Sonu Organizma (Log ₁₀ kob/ml)
<i>P.aeruginosa</i> ATCC 27853	8,079	%0,03	3,477
<i>E.coli</i> ATCC 29998	8,230	%0,03	3,699
<i>S.aureus</i> ATCC 6538 P	8,279	%0,03	2,301
Etden izole edilen <i>P. aeruginosa</i>	8,176	%0,03	3,602
Sütten <i>P. aeruginosa</i>	7,477	%0,03	3,633

Çizelge 1 incelendiğinde *P.aeruginosa*’nın *E.coli* ve *S.aureus*’a kıyasla sodyum hipoklorüre karşı dirençli olmadığı ortaya çıkmıştır. Şenel ve Başoğlu (2002) yaptıkları çalışmada klor bazlı dezenfektanların *P.aeruginosa*, *S. aureus*, *Enterobacter faecalis* ve *Enterobacter aerogenes* üzerine etkili olduğunu saptamışlardır. *Bacillus cereus* ise klor bazlı dezenfektanlardan etkilenmediğini bildirmişlerdir. Külah ve ark.(2002) yaptıkları çalışmada antiseptik ve dezenfektanlar arasından sodyum hipoklorit ve iyodun çalışılan tüm suşlara tüm dilüsyon ve zaman periyotlarında etkili olduğunu saptamışlardır. Bruce ve ark.(1994) pH 7,0 ve 20 °C’de sıcaklıkta yaptıkları bir çalışmada 0,01 ppm lik orandaki klor içeren dezenfektan kullanmışlardır. Araştırmacılar, test mikroorganizması olarak *Aerobacter aerogenes* ve *Esherichia coli*’yi kullanmışlardır. Bu mikroorganizmaları 5 dakika dezenfektanın

etkisinde bırakmışlardır ve bu sürenin sonunda, *Aerobacter aerogenes*’in % 99,8 oranında inaktive olurken *E.coli*’nin ise %99,9 oranında inaktive olduğunu bildirmişlerdir (Bruce et al,1994).

Sodyum hipoklorür; hızlı etkili, geniş antimikrobiyal aktiviteye sahip ve ucuz olduğu için yaygın kullanıma sahip bir dezenfektandır (Rutalo and Weber,1997).

Yapılan çalışmalarda TS EN 1276:1997’nin kullanılmaması ve belirli konsantrasyonların süreye bağlı olarak etkinliğine bakıldığından dolayı araştırmacılarla kıyaslama yapılamamıştır.

***P.aeruginosa* ve Test Organizmalarına Karşı Kuaterner Amonyum Bileşiklerinin Etkisi**

Kuaterner amonyum bileşikleri; çok iyi dezenfektanlar olup daha çok yerlerin, duvarların, eşyaların ve ekipmanların dezenfeksiyonunda kullanılır. Bu dezenfektanların etki mekanizması henüz anlaşılamamıştır. Ancak, enzim inhibisyonu ve hücre elemanlarının dışarıya sızması ile ilişkili olduğu düşünülmektedir (Metin ve Öztürk,1995).

Çizelge 2’de kuaterner amonyum bileşiklerinin *P.aeruginosa* ve test organizmalarına etkisi verilmiştir.

Çizelge 2. Kuarterner Amonyum Bileşiklerinin *P. aeruginosa*, *E. coli*, *S. aureus* ve İzole edilen *P. aeruginosa* Türlerine Karşı Etkinliği

Organizma adı	Başlangıç bakterisi sayısı Log ₁₀ kob/ml	Konsantrasyon	Deney Sonu Organizma Log ₁₀ kob/ml
<i>P.aeruginosa</i> ATCC 27853	8,079	%0,03	4,079
<i>E.coli</i> ATCC 29998	8,230	%0,03	3,505
<i>S.aureus</i> ATCC 6538 P	8,279	%0,03	2,230
Etden izole edilen <i>P. aeruginosa</i>	8,176	%0,03	4,380
Sütten izole edilen <i>P. aeruginosa</i>	7,477	%0,03	4,439

Çizelge 2 incelendiğinde *P.aeruginosa*'nın *E.coli* ve *S.aureus*'a kıyasla kuarterner amonyum bileşiklerine karşı dirençli olduğu bulunmuştur.

Şenel ve Başoğlu (2002) yaptıkları çalışmada kuarterner amonyum bileşiklerinin *E.coli* ve *B.cereus* üzerine etkili olduklarını saptamışlardır. Yapılan diğer çalışmalarda da *P.aeruginosa*, kuarterner amonyum bileşiklerine dirençli olduğu bulunmuştur (Mc Donnel and Russel,1999). Ayrıca RNA grupI'de yeralan *P.stutzeri* ile *P.aeruginosa*'nın antibakteriyal ajanlara karşı cevabına bakıldığında ise *P.stutzeri* (NCIMB 568, 10783, 11358, JM 302)'nin bütün türlerinin klorhegzidin diasetat, organik civalı bileşikler ve triklosan'a karşı yüksek hassasiyet göstermesine karşılık, kuarterner amonyum bileşiklerine karşı daha az hassasiyet gösterdiği belirlenmiştir. *P.stutzeri*'nin antibiyotiklere ve antibakteriyal ajanlara karşı *P.aeruginosa* ile kıyaslandığında daha hassas olduğu bulunmuştur. Bazı patojen mikroorganizmaların kuarterner amonyum bileşikleri için minimum inhibisyon konsantrasyonu şu şekildedir; *Staphylococcus aureus* 4, *E.coli* 16, *Pseudomonas aeruginosa* 64–128 µg/ml'dir (Jones et al,1989).

Yapılan çalışmalarda TS EN 1276:1997'nin kullanılmaması ve belirli

konsantrasyonların süreye bağlı olarak etkinliğine bakıldığından dolayı araştırmacılarla kıyaslama yapılamamıştır.

***P.aeruginosa* ve Test Organizmalarına Karşı Klorhegzidinglukonat'ın Etkisi**

Çizelge 3. Klorhegzidinglukonat'ın *P. aeruginosa*, *E. coli*, *S. aureus* ve İzole edilen *P. aeruginosa* Türlerine Karşı Etkinliği

Organizma adı	Başlangıç bakterisi sayısı Log ₁₀ kob/ml	Konst.	Deney Sonu organizma Log ₁₀ kob/ml
<i>P.aeruginosa</i> ATCC 27853	8,079	%0,02	4,778
<i>E. coli</i> ATCC 29998	8,230	%0,02	4,477
<i>S. aureus</i> ATCC 6538 P	8,279	%0,02	2,361
Etden izole edilen <i>P. aeruginosa</i>	8,176	%0,02	5,204
Sütten izole edilen <i>P.aeruginosa</i>	7,477	%0,02	4,301

Çizelge 3'de Klorhegzidin glukonatın *P. aeruginosa* ve test organizmalarına karşı etkisi verilmiştir. Yaptığımız bu çalışma sonucunda *P.aeruginosa*'nın *E.coli* ve *S.aureus*'a kıyasla klorhegzidin glukonata karşı dirençli olmadığı ortaya çıkmıştır.

Klorhegzidin'in MİK (Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu) çalışmasında *P. aeruginosa* için 20-50 mg/L'den büyük olarak verilmiştir. *P. aeruginosa*'nın bu dezenfektana gram negatif grupta yeralan *E. coli*, *S. typhi*, *Proteus* sp ve *Providencia* sp'den daha dirençli olduğu belirlenmiştir (Russel and Day,1993).

Falaha ve ark.(1985) yaptıkları çalışmada *P. aeruginosa*'nın ve *E.coli*'nin mutantları ve mutant olmayan suşları üzerine klorhegzidin diasetat ve benzalkonium klorit'in etkisini incelemişlerdir. Araştırmanın sonucunda *P. aeruginosa*'nın *E.coli*'den

daha dirençli olduğu saptanmıştır. Basset(1971) yaptığı çalışmada *P.cepacia* klorhegzidin glukonatin % 0,05'lik konsantrasyonunun 1/30'luk distile suda seyreltilmesiyle elde edilen karışıma adapte olmuştur. Aynı organizma aynı konsantrasyondaki çeşme suyunda ise canlılığını devam ettirememiştir. Aynı çalışmada *P.aeruginosa* ve *P.cepacia* birlikte kıyaslandığında ise *P.cepacia*'nın ise klorhegzidin glukonata karşı daha dirençli olduğu bulunmuştur

Yapılan çalışmalarda TS EN 1276:1997'nin kullanılmaması ve belirli konsantrasyonların süreye bağlı olarak etkinliğine bakıldığından dolayı araştırmacılarla kıyaslama yapılamamıştır.

Temiz ve Organik Madde İçeren Yüzeylerde Kuaterner amonyum bileşikleri ve Klorhegzidin glukonatin *P.aeruginosa*'ya Etkisi

P. aeruginosa ve *E. coli*'yi birlikte kıyasladığımızda kuaterner amonyum bileşikleri ve klorhegzidin glukonata karşı *P.aeruginosa*'nın dirençli olduğu bulunmuştur. Piyasada satılan dozun 10^6 hücre/ml'yi öldürüp öldürmediğini saptamak için bu deneme yapılmıştır. Çizelge 4'de deneme sonuçları verilmiştir.

Çizelge 4. Temiz ve Organik Madde İçeren Yüzeylerde Kab ve Klorhegzidin glukonatin *P. aeruginosa*'ya Etkisi

	KAB(Azalma)	KG(Azalma)
Başlangıç hücre sayısı (Log ₁₀ kob/50cm ²) Temiz yüzey 2,1x10 ⁶ /50cm ²	%100	%100
Başlangıç hücre sayısı (Log ₁₀ kob/50cm ²) Sütlü yüzey 1,2x10 ⁶ /50cm ²	%100	%100

TS EN1276 temas süresi olarak 5 dakikayı önermektedir. Bu çalışmada dezenfektan uygulanmayan kontrol alan yüzeye aktarılan mikroorganizma sayısını saptamak için kullanılmıştır. Çalışma sonucunda gerek temiz yüzeylerde gerekse organik madde içeren yüzeylerde kullanılan dezenfektanların piyasadaki dozunun *P.aeruginosa*'nın 10^6 hücre/ml'sini öldürmeye yeterli olduğu ortaya çıkmıştır.

Yaptığımız bu çalışma sonucunda *P.aeruginosa*'nın diğer test organizmalara kıyasla kuaterner amonyum bileşikleri ve klorhegzidin glukonata karşı dayanıklı olduğu ve piyasada kullanılan dozun, bu bakterinin tamamının (10^6 hücre/ml) öldürülmesinde etkili olduğu ortaya çıkmıştır.

KAYNAKLAR

- 1.Nickerson JT, Sinskey AJ. 1977. Microbiology of foods and food processing, Elsevier NorthHolland, 306s.
2. Bilgehan H. 2000. Klinik Mikrobiyoloji- Özel Bakteriyoloji ve Bakteri Enfeksiyonları. Barış Yayınları,487s, İzmir.
- 3.TS EN 1276:1997. Kimyasal dezenfektanlar ve antiseptikler gıda, sanayi, ev ve kuruluşlarda kullanılan kimyasal dezenfektanlar ve antiseptiklerin bakterisidal aktivitelerinin değerlendirilmesi için nicel süspansiyon deneyi- Deney yöntemi ve Özellikler, Nisan.
- 4.Uraz G, Çıtak S. 1998. Çeşitli yörelerden sağlanan çeşitli çiğ süt örneklerinden Pseudomonas'ların izolasyonu ve dağılımı üzerine bir araştırma.Tr.J.of Agriculture and Forestry, 22:469-474
- 5.TS :13720 .1997. Et ve et ürünleri *Pseudomonas* spp sayımı
- 6.Şanlı Y. 1999.Veteriner Klinik Farmakoloji. Medipres Yayıncılık.342s. Ankara.
- 7.Özenli F. 1988. Sağlık ve Hijyen. Veteriner Hekimlikte Dezenfeksiyon ve Hastalıklara Karşı Önlemler. 1. Baskı. Mega Basım Yayın San. Ve Tic. A.Ş.,254s, İstanbul.

- 8.Akyer N. 2002. Gıdalarda Mikrobiyal Toksinler ve Dezenfeksiyon. *Biyotek*, 2:29-32.
- 9.Şenel Y ve Başoğlu F. 2002. Gıda işletmelerinde kullanılan bazı dezenfektanların mikroorganizmalar üzerine etkisi. *Uludağ Üniver. Zir. Fak. Derg*, 16:105-115.
- 10.Külah C, Doğan B, Gökdal İ, Çırak YM ve Rota S. 2002. Yoğun bakım ünitesi kaynaklı bazı non fermentatif gram negatif bakterilerin çeşitli antiseptik ve dezenfektanlara duyarlılıkları. *Ankem Dergisi*,16(1)31-35.
- 11.Bruce R, Cords G, Dychdala G. 1994. *Disinfection, Sterilization and Preservation*, AVI publishing,530s, Philedelphia.
- 12.Rutalo WA, Weber DJ. 1997. Uses of inorganic hypochloride (bleach) in health-care facilities. *Clinic Microbiol. Review*,10:597-604
- 13.Metin M, Öztürk F. 1995. Süt İşletmelerinde Sanitasyon. Ege Üniversitesi Meslek Yüksek Okulu Yayınları no:17,157s, İzmir.
14. Mc Donnell G, Russel A.D. 1999. Antiseptics and Disinfectants, Activity, Action and Resistance. *Clin. Microbiol. Rev* , Jan: 147-149.
15. Jones MT, Herd TM and Christie HJ. 1989. Resistance of *P.aeruginosa* to amphoteric and quaternary ammonium biocides. *Microbios*, 58: 49-61.
- 16.Russel AD, Day MJ. 1993. Antibacterial activity of chlorhexidine. *J. Hospital Infect*, 25: 229-238.
- 17.Falaha BMA, Russel AD, Furr JR. 1985. Effect of chlorhexidine diacetate and benzalkonium chloride on the viability of wild type and envelope mutants of *Esherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Leters in Applied Microbiology*, 1:21-25.
- 18.Basset DCJ. 1971. The Efect of pH on Multiplication of a Pseudomonad in Chlorhexidine and Cetrimide. *J.Clin Pathol*, 24:708-711.

Geliş Tarihi:25.02.2007

Kabul Tarihi:16.06.2008