

**ÇEŞİTLİ KAYNAKLARDAN İZOLE EDİLEN *Pseudomonas* CİNSİ
BAKTERİLERİN AĞIR METAL VE NAFTALİN TOLERANSI**

Sibel GÜLCAN

**Eylül 2006
DENİZLİ**

**ÇEŞİTLİ KAYNAKLARDAN İZOLE EDİLEN *Pseudomonas* CİNSİ
BAKTERİLERİN AĞIR METAL VE NAFTALİN TOLERANSI**

**Pamukkale Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Yüksek Lisans Tezi
Biyoloji Anabilim Dalı**

Sibel GÜLCAN

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Nazime MERCAN

**Eylül 2006
DENİZLİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ ONAY FORMU

Sibel GÜLCAN tarafından Yrd. Doç. Dr. Nazime MERCAN yönetiminde hazırlanan **“Çeşitli Kaynaklardan İzole Edilen *Pseudomonas* Cinsi Bakterilerin Ağır Metal ve Naftalin Toleransı”** başlıklı tez tarafımızdan okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.



Doç. Dr. Ahmet Hilmi ÇON

Jüri Başkanı



Yrd. Doç. Dr. Hikmet KATIRCIOĞLU

Jüri Üyesi



Yrd. Doç. Dr. Nazime MERCAN

Jüri Üyesi (Danışman)

Pamukkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu’nun
....../... /.... tarih ve sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Mehmet Ali SARIGÖL
Müdür

TEŞEKKÜR

2003-2006 yılları arasında Pamukkale Üniversitesi, Biyoloji Bölümü'nde, Yrd. Doç. Dr. Nazime MERCAN' nın danışmanlığı altında yürütülen bu çalışma yüksek lisans tezi olarak hazırlanmıştır.

Tez çalışmamın başından sonuna kadar ilgi ve yardımlarını esirgemeyen, tecrübe ve eşsiz bilgilerinden yararlandığım hocam Yrd. Doç. Dr. Nazime MERCAN'a,

Laboratuar çalışmalarında desteklerini ve yardımlarını esirgemeyen Pamukkale Üniversitesi, Gıda Mühendisliği Bölüm hocalarından, Doç. Dr. Ahmet Hilmi ÇON'a,

Tez çalışmamda kullanılan örneklerin temin edilmesinde yardımlarını esirgemeyen Doç. Dr. Yakup KASKA'ya, Yrd. Doç. Dr. Mustafa DURAN'a ve Salih MERCAN'a,

Yüksek lisans eğitimim boyunca her türlü desteğini esirgemeyen Gıda Müh. Ebuzer MAŞALI'ya, tez yazımında yardımcı olan kardeşim Sevgül GÜLCAN'a ve aileme sonsuz teşekkür ederim.

Bu tezin tasarımı, hazırlanması, yürütülmesi, araştırmalarının yapılması ve bulgularının analizlerinde bilimsel etiğe ve akademik kurallara özenle riayet edildiği; bu çalışmanın doğrudan birincil ürünü olmayan bulguların, verilerin ve materyallerin bilimsel etiğe uygun olarak kaynak gösterildiğini ve alıntı yapılan çalışmalara atfedildiğini beyan ederim.

İmza

:



Öğrenci Adı Soyadı

:

Sibel GÜLCAN

ÖZET

ÇEŞİTLİ KAYNAKLARDAN İZOLE EDİLEN *Pseudomonas* CİNSİ BAKTERİLERİN AĞIR METAL VE NAFTALİN TOLERANSI

Gülcan, Sibel
Yüksek Lisans Tezi, Biyoloji ABD
Tez Yöneticisi: Yrd. Doç. Dr. Nazime MERCAN

Eylül 2006, 80

Bu çalışmada çeşitli kaynaklardan toplam 13 adet *Pseudomonas* cinsi bakteri izole edilmiştir. Bakterilerin identifikasyon testleri sonucunda 6 adedi *Pseudomonas stutzeri*, 3 adedi *Pseudomonas putida*, 2 adedi *Pseudomonas aeruginosa*, 1 adedi *Pseudomonas fluorescens* ve 1 adedi *Pseudomonas mendocina* olarak tanımlanmıştır.

Suşların gelişim gösterdikleri optimum aralıklar belirlenmiştir. *P. fluorescens* P26 dışında bütün suşların 45 ve 50°C’de üreyemediği tespit edilmiştir. Bakteriler arasında *P. putida* P41’in 4°C’de gelişebildiği gözlenmiştir.

Suşların antibiyotik duyarlılıkları disk difüzyon metodu ile tespit edilmiştir. Suşların tamamı cefoclor, cefuroxime, cephalothin, cefadroxil, novobiocin, ampicillin, vankomisin, cefoxitin, gentamisin, clindamycin, oxacillin ve teicoplanin antiyotiklerine dirençli bulunmuştur. Imipenem antibiyotiğine çalışmada kullanılan *Pseudomonas* suşlarının tamamına karşı etkili bulunmuştur. Ayrıca *P. putida* P41 çalışmada kullanılan antibiyotiklere karşı en dirençli suş olarak belirlenmiştir.

Pseudomonas suşlarının bazı patojen ve kontaminant *Candida albicans*, *Bacillus cereus* RSKK 863, *B. subtilis* ATCC 6633, *S. aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus aureus* ATCC 12598, *Escherichia coli* ATCC 25922, *E. coli* ATCC 35218, *Klebsiella pneumonia* ATCC 27736, *Micrococcus luteus* NRRL B-4375, *Proteus vulgaris* ATCC 96026, *Pseudomonas aeruginosa* NRRL B-23, ve *Yersinia enterocolitica* RSKK 1501 üzerine inhibisyon etkileri agar-kuyu difüzyon yöntemi ile belirlenmiştir.

Pseudomonas suşlarının tümünün lipaz ürettikleri belirlenmiştir. *P. aeruginosa* P16, *P. aeruginosa* P22, *P. stutzeri* P19 ve *P. stutzeri* P27’nin Skim Milk Agar’da aproteaz aktivitesine sahip olduğu tespit edilmiştir.

Pseudomonas suşlarının ağır metal toleransları agar kuyu difüzyon metodu kullanılarak belirlenmiştir. Birçok suş mangana karşı direçli bulunurken, kobalt, krom ve kadmiyumun bakteriler üzerine etkili ağır metal olduğu tespit edilmiştir.

Çalışmada, *P. aeruginosa* P16, *P. stutzeri* P27, *P. stutzeri* P39 ve *P. fluorescens* P26 suşlarının naftalin içeren Nutrient Broth besi ortamında gelişebildikleri tespit edilmiştir.

Anahtar kelimeler: *Pseudomonas*, ağır metal, naftalin, lipolitik aktivite, proteolitik aktivite, API 20NE, pigmentasyon

Yrd. Doç. Dr. Nazime MERCAN
Doç. Dr. Ahmet Hilmi ÇON
Yrd. Doç. Dr. Hikmet KATIRCIOĞLU

ABSTRACT

DETERMINATION OF HEAVY METAL AND NAPHTHALENE TOLERANCE OF *Pseudomonas*, ISOLATED FROM DIFFERENT SOURCES

Gulcan, Sibel

M. Sc.Thesis in Biology

Supervisor: Asst. Prof. Dr. Nazime MERCAN

September 2006, 80

In this research, a total of 13 *Pseudomonas* strains were isolated from different sources. According to the identification results, 6 species were *Pseudomonas stutzeri*, 3 species were *Pseudomonas putida*, 2 species were *Pseudomonas aeruginosa*, 1 species were *Pseudomonas fluorescens* and 1 species were *Pseudomonas mendocina*.

Growth parameters of strains were determined. All strains weren't able to grow at 45 and 50°C except *P. fluorescens* P26. It was also found that only *P. putida* P41 grow at 4°C.

The susceptibility level of these strains to antibiotics was identified with disc diffusion method. It was found that all strains were resistance to cefoclor, cefuroxime, cephalothin cefadroxil, novobiocin, ampicillin, vankimisin, cefoxitin, gentamisin, clindamycin, oxacillin and teicoplanin. Imipenem was effective to the species belonging to *Pseudomonas* genera. In addition, *Pseudomonas putida* P41 was found the most resistance strain against antibiotics.

Antimicrobial activity of *Pseudomonas* strains against *C. albicans*, *B. cereus* RSKK 863, *B. subtilis* ATCC 6633, *Staphylococcus aureus* ATCC 12598, *E. coli* ATCC 25922, *E. coli* ATCC 35218, *K. pneumonia* ATCC 27736, *M. luteus* NRRL B-4375, *Pr. vulgaris* ATCC 96026, *P. aeruginosa* NRRL B-23, *S. aureus* ATCC 25923 and *Y. enterocolitica* RSKK 1501 were examined by agar diffusion method.

The result showed all *Pseudomonas* strains were observed produced to be lypolytic activity on Trybutyrin Agar. *P. aeruginosa* P16, *P. aeruginosa* P22, *P. stutzeri* P19 and *P. stutzeri* P27 was determined that strain producing protease enzyme on Skim Milk Agar.

The heavy metal resistance level of these strains were determined with agar diffusion method. Most of the strains were found to be resistant to manganase. Cobalt, chromium and cadmium was more toxic than other metals

Biodegradation ability of *Pseudomonas* P16, *P. stutzeri* P27, *P. stutzeri* P39 ve *P. fluorescens* P26 was determined in NB including an aromatic hydrocarbon as a sole carbon source. It was showed that *Pseudomonas* strains were able to grow Nutrient Broth medium that including naphthalene.

Keywords: *Pseudomonas*, metals, naphthalene, lypolytic activity, proteolytic activity, API 20NE, pigmentation

Asst. Prof. Dr. Nazime MERCAN
Assoc. Prof. Dr. Ahmet Hilmi ÇON
Asst. Prof. Dr. Hikmet KATIRCIOĞLU

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
YÜKSEK LİSANS TEZİ ONAY FORMU	i
TEŞEKKÜR	ii
ETİK SAYFASI	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
TABLolar DİZİNİ	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xiii
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL BİLGİLER VE LİTERATÜR TARAMASI	2
2.1 Mikroorganizmalar ve Metaller	2
2.2 Mikrobiyal Metal Dirençlilik Mekanizmaları	3
2.3 Naftalin Biyodegradasyonu	7
2.3.1 Mikroorganizmaların biyodegradasyondaki rolü	9
2.4 <i>Pseudomonas</i> cinsinin genel özellikleri	10
2.4.1 Habitatları	10
2.4.2 Morfolojisi ve hücre yapısı	11
2.4.3 Pigmentasyon	11
2.4.4 Gelişme ortamları ve fizyolojik özellikleri	12
2.4.5 Antimikrobiyal ajanlara dirençlilik	13
2.4.6 Plazmid DNA	15
2.4.7 Antimikrobiyal Aktivite	15
2.4.8 Lipolitik ve proteolitik enzim üretimi	16
3. MATERYAL VE METOT	17
3.1 Materyal.....	17
3.1.1 İzolasyon kaynakları	17
3.1.2 Araştırmada kullanılan besiyerleri ve kimyasal malzemeler	18
3.1.3 API 20NE identifikasyon kiti (Biomerieux)	20
3.2 Metot	23
3.2.1 Bakterilerin izolasyonu	23
3.2.2 İzole edilen suşların muhafazası	23
3.2.3 Bakterilerin tiplendirilmesi	23
3.2.4 İzolatların hemoliz özelliklerinin belirlenmesi	24
3.2.5 İzolatların katalaz aktivitelerinin belirlenmesi	25
3.2.6 İzole edilen <i>Pseudomonas</i> suşlarının gelişim gösterdikleri optimum koşulların belirlenmesi	25
3.2.7 <i>Pseudomonas</i> suşlarının antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesi	25
3.2.8 <i>Pseudomonas</i> suşlarının bazı patojen ve kontaminant mikroorganizmalar üzerine inhibisyon etkisi	27

3.2.9 İzolatların proteolitik aktivitelerinin belirlenmesi	27
3.2.10 İzolatların lipolitik aktivitelerinin belirlenmesi	28
3.2.11 İzolatların ağır metallere karşı dirençliliklerinin belirlenmesi	28
3.2.12 Naftalin toleransı	29
4. BULGULAR	31
4.1 Bakterilerin İzolasyonu ve Biyokimyasal Testler	31
4.2 Bakterilerin Tiplendirilmesi	31
4.3 İzole Edilen <i>Pseudomonas</i> Suşlarının Gelişim Gösterdikleri Optimum Koşulların Belirlenmesi.....	35
4.4 İzole Edilen <i>Pseudomonas</i> Suşlarının Antibiyotik Duyarlılıklarının Belirlenmesi.....	37
4.5 <i>Pseudomonas</i> Suşlarının Bazı Patojen ve Kontaminant Mikroorganizmalar Üzerine İnhibisyon Etkisi	40
4.6 İzole Edilen <i>Pseudomonas</i> Suşlarının Proteolitik Aktivitelerinin Belirlenmesi.....	41
4.7 İzole Edilen <i>Pseudomonas</i> Suşlarının Lipolitik Aktivitelerinin Belirlenmesi.....	43
4.8 İzolatların Ağır Metallere Karşı Dirençliliklerinin Belirlenmesi	43
4.9 Naftalin Toleransı	48
5. TARTIŞMA	54
6. SONUÇ	71
KAYNAKLAR	72
ÖZGEÇMİŞ	80

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 4.1 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> P16 suşunun Nutrient Agar’da pigment üretimi	32
Şekil 4.2 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> P16 suşunun API 20NE kitindeki reaksiyonları	33
Şekil 4.3 <i>P. aeruginosa</i> P16’nın <i>S. aureus</i> ATCC 25923 üzerine inhibisyon zonu	42
Şekil 4.4 <i>P. aeruginosa</i> P16’nın spot ve agar kuyu yöntemi ile belirlenen proteolitik aktivite inhibisyon zon çapı	42
Şekil 4.5 7,5 µg/ml naftalin varlığında <i>P. aeruginosa</i> P16 bakterisinin gelişim eğrisi	49
Şekil 4.6 7,25 µg/ml naftalin varlığında <i>P. aeruginosa</i> P22 bakterisinin gelişim eğrisi	49
Şekil 4.7 7,25 µg/ml naftalin varlığında <i>P. putida</i> P18 bakterisinin gelişim eğrisi	49
Şekil 4.8 5,0 µg/ml naftalin varlığında <i>P. putida</i> P41 bakterisinin gelişim eğrisi	50
Şekil 4.9 5,5 µg/ml naftalin varlığında <i>P. putida</i> P43 bakterisinin gelişim eğrisi	50
Şekil 4.10 7,25 µg/ml naftalin varlığında <i>P. stutzeri</i> P19 bakterisinin gelişim eğrisi	50
Şekil 4.11 7,5 µg/ml naftalin varlığında <i>P. stutzeri</i> P27 bakterisinin gelişim eğrisi	51
Şekil 4.12 7,5 µg/ml naftalin varlığında <i>P. stutzeri</i> P39 bakterisinin gelişim eğrisi	51
Şekil 4.13 7,5 µg/ml naftalin varlığında <i>P. stutzeri</i> P40 bakterisinin gelişim eğrisi	51
Şekil 4.14 6,25 µg/ml naftalin varlığında <i>P. stutzeri</i> P44 bakterisinin gelişim eğrisi	52
Şekil 4.15 6,25 µg/ml naftalin varlığında <i>P. stutzeri</i> P46 bakterisinin gelişim eğrisi	52
Şekil 4.16 7,0 µg/ml naftalin varlığında <i>P. fluorescens</i> P26 bakterisinin gelişim eğrisi	52
Şekil 4.17 6,25 µg/ml naftalin varlığında <i>P. mendocina</i> P45 bakterisinin gelişim eğrisi	53

TABLOLAR DİZİNİ

	Sayfa
Tablo 3.1 Bakterilerin izole edildiği kaynaklar ve bölgeler	17
Tablo 3.2 API 20NE okuma tablosu	22
Tablo 3.3 Çalışmada kullanılan antibiyotik diskleri ve konsantrasyonları	26
Tablo 4.1 İzolatların bazı biyokimyasal test sonuçları.....	32
Tablo 4.2 API 20NE identifikasyon kitiyle yapılan biyokimyasal testlerin sonuçları	33
Tablo 4.3 İzolatların adları, izolasyon kaynakları ve doğruluk yüzdeleri.....	34
Tablo 4.4 <i>Pseudomonas</i> suşlarının farklı tuz konsantrasyonlarında gelişimi	35
Tablo 4.5 <i>Pseudomonas</i> suşlarının farklı pH değerlerinde gelişimi.....	36
Tablo 4.6 <i>Pseudomonas</i> suşlarının farklı sıcaklık değerlerinde gelişimi.....	37
Tablo 4.7 <i>Pseudomonas</i> suşlarının bazı antibiyotiklere karşı gösterdikleri inhibisyon zon çapları (mm)	38
Tablo 4.8 Suşların inhibisyon zon çaplarına göre antibiyotiklere olan dirençlilik ve duyarlılıkları.....	39
Tablo 4.9 <i>Pseudomonas</i> suşlarının bazı patojen ve kontaminant bakteriler üzerindeki antimikrobiyal aktivitesini gösteren inhibisyon zonlarının çapları (mm).....	40
Tablo 4.10 <i>Pseudomonas</i> suşlarının proteolitik aktivite zon çapları (mm).....	41
Tablo 4.11 <i>Pseudomonas</i> suşlarının lipolitik aktiviteleri.....	42
Tablo 4.12 <i>Pseudomonas</i> suşlarının farklı MnSO ₄ konsantrasyonlarına karşı göstermiş oldukları inhibisyon zon çapları (mm : çap).....	43
Tablo 4.13 <i>Pseudomonas</i> suşlarının farklı Cd(NO ₃) ₂ konsantrasyonlarına karşı göstermiş oldukları inhibisyon zon çapları (mm : çap).....	43
Tablo 4.14 <i>Pseudomonas</i> suşlarının farklı Pb(NO ₃) ₂ konsantrasyonlarına karşı göstermiş oldukları inhibisyon zon çapları (mm : çap).....	44
Tablo 4.15 <i>Pseudomonas</i> suşlarının farklı CuSO ₄ konsantrasyonlarına karşı göstermiş oldukları inhibisyon zon çapları (mm : çap).....	44
Tablo 4.16 <i>Pseudomonas</i> suşlarının farklı N ₂ NiO ₆ konsantrasyonlarına karşı göstermiş oldukları inhibisyon zon çapları (mm : çap).....	44
Tablo 4.17 <i>Pseudomonas</i> suşlarının farklı ZnSO ₄ konsantrasyonlarına karşı göstermiş oldukları inhibisyon zon çapları (mm : çap).....	45
Tablo 4.18 <i>Pseudomonas</i> suşlarının farklı Al(NO ₃) ₃ konsantrasyonlarına karşı göstermiş oldukları inhibisyon zon çapları (mm : çap).....	45
Tablo 4.19 <i>Pseudomonas</i> suşlarının farklı CrN ₃ O ₉ konsantrasyonlarına karşı göstermiş oldukları inhibisyon zon çapları (mm : çap).....	45
Tablo 4.20 <i>Pseudomonas</i> suşlarının farklı CoN ₂ O ₆ konsantrasyonlarına karşı göstermiş oldukları inhibisyon zon çapları (mm : çap).....	46
Tablo 4.21 <i>Pseudomonas</i> suşlarının farklı MnZn konsantrasyonlarına karşı göstermiş oldukları inhibisyon zon çapları (mm : çap).....	46
Tablo 4.22 <i>Pseudomonas</i> suşlarının farklı MnCu konsantrasyonlarına karşı göstermiş oldukları inhibisyon zon çapları (mm : çap).....	46

Tablo 4.23 <i>Pseudomonas</i> suşlarının farklı CuZn konsantrasyonlarına karşı göstermiş oldukları inhibisyon zon çapları (mm : çap)	47
Tablo 4.24 <i>Pseudomonas</i> suşlarının farklı MnZnCu konsantrasyonlarına karşı göstermiş oldukları inhibisyon zon çapları (mm : çap).....	47
Tablo 4.25 <i>Pseudomonas</i> suşlarının farklı CdCr konsantrasyonlarına karşı göstermiş oldukları inhibisyon zon çapları (mm : çap)	47
Tablo 4.26 <i>Pseudomonas</i> suşlarının farklı CdCo konsantrasyonlarına karşı göstermiş oldukları inhibisyon zon çapları (mm : çap).....	47
Tablo 4.27 <i>Pseudomonas</i> suşlarının farklı CoCr konsantrasyonlarına karşı göstermiş oldukları inhibisyon zon çapları (mm : çap)	47
Tablo 4.28 <i>Pseudomonas</i> suşlarının farklı CdCrCo konsantrasyonlarına karşı göstermiş oldukları inhibisyon zon çapları (mm : çap).....	48
Tablo 4.29 <i>Pseudomonas</i> suşlarının MİK değerleri	48

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Bu çalışmada kullanılan kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Simgeler	Açıklama
α	Alfa
β	Beta
dk	Dakika
g	Gram
ml	Mililitre
mm	Milimetre
mmol	Milimol
μ g	Mikrogram
μ l	Mikrolitre
μ m	mikrometre
N	Normalite
NA	Nutrient agar
NB	Nutrient broth
NCCLS	The National Committee for Clinical Laboratory
rpm	Devir sayısı
vd	Ve diğerleri

1. GİRİŞ

Oldukça yüksek karsinojenik özelliğe sahip olan aromatik ve polisiklik hidrokarbonlar (PAH) ile kontamine olmuş bir çok toprak, aynı zaman da PAH-degrade eden mikroorganizma içermektedir. Günümüzde PAH'ları degrade eden çok sayıda mikroorganizma izole edilmiştir. Örneğin, PAH'ların en bilineni olan naftalini degrade edebilen *Pseudomonas putida* G7, *Rhodococcus* sp. B4, *Oscillatoria* sp. JCM ve *Alcaligenes* sp. NP-Alk üzerine yoğun bir şekilde çalışmalar sürmektedir (Lee vd 2003). PAH'ların az çözünürlükleri, biyolojik yararlanımlarının az oluşu, ortamdaki azot veya diğer besinlerin sınırlanması, PAH'ların biyodegradasyonunu inhibe edici başka organik kirleticiler ve ağır metalle ortamın kontaminasyonu gibi çeşitli faktörler bu mikroorganizmaların degradasyon kapasitelerini de sınırlamaktadır. Özellikle bakterilerin biyodegradatif özelliklerinin ortamdaki ağır metallerin varlığıyla etkilendiği de bildirilmiştir (Yoo vd 2004).

Aslında normal şartlarda doğada atık-kirletici bulunmamalıdır. Çünkü herşey geri dönüşümlü olarak yeniden işlenip tekrar kullanılmaktadır. Mikroorganizmalar ortamdaki atık organik maddeleri karbon ve enerji kaynağı olarak kullanmakta ve yeni organik maddelere dönüştürmektedirler. Ortama verilen bu organik maddeler ise başka organizmaların besin ve enerji kaynağını oluşturmaktadır (Bruins vd 2000a, Chang vd 1997, Kerry 1993). Ancak günümüzde bu doğal denge olumsuz yönde bozulmuştur. İnsanoğlu ilerde sağlıklı bir yaşam ve daha temiz bir dünya için ya atık üretimini azaltmalı ya da çevresel kontaminant yaratan maddeleri ortamdaki temizlemelidir. Son zamanlarda çevresel kontaminantların ortamdaki uzaklaştırılması amacıyla mikroorganizmaların biyodegradatif özelliklerinden yararlanılmaktadır (Leahy ve Colwell 1990). Mikroorganizmaların bu özellikleri çeşitli dış etkilere etkilenebilir. Bu nedenle bu çalışmada mikroorganizmaların degradatif özellikleri incelenirken ağır metaller ve antibiyotik dirençlilikleri de çalışma kapsamına alınmıştır.

2. KURAMSAL BİLGİLER VE LİTERATÜR TARAMASI

2.1. Mikroorganizmalar ve Metaller

Mikroorganizmaların yaşamında metallerin bütünleyici bir rolü vardır. Kalsiyum, kobalt, bakır, krom, demir, potasyum, magnezyum, manganez, sodyum, nikel, çinko gibi bazı metaller esansiyeldir ve besinsel rolleri vardır. Gümüş, alüminyum, kadmiyum, altın, civa ve kurşun gibi metallerin ise biyolojik rolleri yoktur ve esansiyal değildirler. Esansiyal metaller; biyokimyasal reaksiyonları katalizlemek, protein yapısını ve bakteri hücre duvar yapısını stabilize etmek, osmotik dengeyi korumak, gen ekspresyonunu düzenlemek, biyomolekülleri aktive etmek, elektron alıcısı veya vericisi olarak enerji metabolizmasında önemli rol oynamaktadırlar (Bruins vd 2000b, Ehrlich 1997).

Demir, bakır, nikel gibi esansiyal geçiş metalleri redoks tepkimelerinde rol alırken, magnezyum ve çinko gibi esansiyal metaller elektrostatik güçleri sayesinde çeşitli enzimleri ve DNA'yı stabilize etmektedirler. Demir, nikel, magnezyum ve kobalt, düzenleyicilik görevi olan kompleks moleküllerin yapısında yer almaktadır. Potasyum ve sodyumun ise hücre içi osmotik basıncın düzenlenmesinde rolü vardır (Bruins vd 2000b).

Co^{2+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} ve Zn^{2+} gibi esansiyal metal iyonlarının yüksek konsantrasyonu ve esansiyal olmayan metal iyonları mikroorganizmalar üzerinde toksik etki yaratmaktadır. Esansiyel olmayan metal iyonları, esansiyel metal iyonlarının bağlandığı doğal bağlanma bölgelerine bağlanarak veya ligandlar ile karşılıklı etkileşime girerek toksik etkilerini göstermektedirler. Bu tür metallerin, tiol (-SH) içeren gruplara veya oksijen bölgelerine olan affiniteleri, esansiyal metallerin affinitesinden daha yüksektir (Bruins vd 2000b, Silver 1998, Sandrin ve Maler 2003).

Metal iyonları yüksek konsantrasyonlarda canlı üzerine toksik etki de göstermektedir. Toksik etkileri arasında nükleik asitlerin ve proteinlerin yapısında

değişikliklerin meydana gelmesi, oksidatif fosforilasyonu etkilemeleri ve osmotik dengenin bozulması sayılabilir (Hassen 1998a, Bruins vd 2000b).

2.2. Mikrobiyal Metal Dirençlilik Mekanizmaları

Esansiyal ve esansiyal olmayan metallerin, çevredeki konsantrasyonlarının, toksik seviyeye ulaşması durumunda insan ve hayvan sağlığını olumsuz yönde etkilediği kuşku götürmemektedir. Aynı zaman da birçok mikroorganizmanın çeşitli metallerin varlığında gelişimlerini devam ettirebildiği de bilinmektedir (Bruins vd 2000b, Choudhury ve Srivastava 2001).

Yapılan araştırmalarda bazı metallere dirençli mikroorganizmalar teşhis edilmiştir. Bu çalışmalar, çoğunlukla, *Staphylococcus* sp., *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Bacillus* sp. gibi önemli dirençlilik gösteren Gram-negatif ve Gram-pozitif aerobik bakterileri içermektedir. Toksik metallere karşı direnç mekanizmalarının geliştirilmesine yol açan etmen, mikroorganizmaların bulunduğu çevrede, toksisiteye sebep olan metalin varlığı ve bu metalin organizma üzerinde yarattığı stresdir (Guzzo vd 1999).

Mikroorganizmalardaki metal dirençlilik mekanizmaları; geçirgen bariyer sayesinde metallerin hücre dışında bırakılması, aktif transport ile metalin mikroorganizmadan uzaklaştırılması, intrasellüler ayırım, metallerin enzimatik detoksifikasyon ile daha az toksik hale getirilmesi ve hücresel hedeflerin metal duyarlılıklarının azaltılması şeklinde olabileceği bildirilmiştir (Silver 1992, Bruins vd 2000b).

Geçirgen bariyer sayesinde, metallerin hücre dışında bırakılması; mikroorganizmanın hücre duvarında, membranında veya zarfında bir takım değişiklikler meydana getirilmektedir ve bu mekanizma sayesinde mikroorganizma metale duyarlı olan önemli hücresel komponentlerini korumaktadır. Örneğin, *E. coli* ile yapılan bir çalışmada bakterinin membran kanal proteini olan porinlerin sayısını azaltmak suretiyle gümüş iyonlarının hücre içine girişinin engellendiği bildirilmiştir (Li vd 1997).

Metal iyonları, dış membrana ve kapsüle non-spesifik olarak bağlanabilmektedir. Bu bağlanma, dış membranda yer alan $-NH_2$, $-SH$, $-OH$, $-SO_3H$, $-COOH$ ve $-PO_3H$ grupları ile metal iyonları arasındaki spesifik olmayan etkileşim ile gerçekleşmektedir (Gazso 2001). Bakterilerin doğal olarak sahip oldukları ekstrasellüler polisakkarit tabaka, metal

iyonlarını biyosorblama yeteneğine sahiptir ve bu sayede bu iyonların hücre komponentleri ile etkileşime girmesi önlenmektedir. Bağlanma bölgesinin doygunluğa ulaşmasından dolayı metale karşı sınırlı bir koruma sağlanmaktadır (Gavrilescu 2004). Metal iyonlarını bağlayabilme özelliğine sahip bakterilere *Klebsiella aerogenes*, *Pseudomonas putida* ve *Arthrobacter viscosus* örnek olarak verilebilir (Emtiaza vd 2004).

Yapılan bir çalışmada, koruyucu EPS tabakası içeren *Arthrobacter viscosus*'un bu tabakaya sahip olmayan *Arthrobacter globiformis* suşuna göre daha fazla Cd(II) bağlayabildiği gösterilmiştir (Scott ve Palmer 1988).

McEldowney (2000) tarafından yapılan bir çalışmada ise, *P. fluorescens* H2'nin gelişme ortamına ilave edilen Cd^{2+} 'nin %65'ini hücre duvarına bağlayabildiği gösterilmiştir (McEldowney 2000). -40°C'den -50°C'ye kadar soğutularak inaktive hale getirilen *Pseudomonas putida*'nın Cd(II), Cu(II), Pb(II) ve Zn(II)'yi bağlayabildiği gösterilmiştir (Pardo vd 2003). Benzer bir çalışmada, inaktif *P. aeruginosa* PU21'in kurşun, bakır ve kadmiyumu bağladığı tespit edilmiştir (Chang vd 1997). Hücrelerin metal bağlanma özelliklerinin pH ile değiştiği gösterilmiştir (McEldowney 2000, Pardo vd 2003).

Tam olarak kanıtlanmamakla beraber, bazı bakır dirençlilik tiplerinin periplazmik bağlanmaya dayandığı sanılmaktadır. Cu(II) dirençliliği operonda yer alan copA, copB, copC ve copD olarak adlandırılan genler tarafından sağlanmaktadır. Bu genlerden, copA ve copB kısmi dirençlilik sağlarken copC ve copD genleri Cu(II)'ye karşı tam dirençlilik sağlamaktadır. CopA ve copC proteinleri iç ve dış membran arasında, copB proteinleri ise dış membranda bulunmaktadır. Bu proteinlerin lokalizasyonu, dirençliliğin ya periplazmik bağlanmadan veya ekstrasellüler ayırmadan kaynaklandığını desteklemektedir (Silver 1998).

Mikroorganizmaların dışında alglerin, küflerin ve mayaların da çeşitli metalleri bağlayabildiği belirtilmiştir (Vieira ve Volesky 2000).

Metal dirençlilik sistemlerinin büyük bir kısmını aktif transport veya taşıma sistemleriyle metalin mikroorganizmadan uzaklaştırılması oluşturmaktadır. Mikroorganizmalar toksik metalleri sitoplazmalarından uzaklaştırmak için aktif transportu kullanırlar. Non-esansiyal metaller normal olarak besin taşıma sistemleri ile

hücre içine girmektedir. Fakat hızlı bir şekilde hücre dışına taşınmaktadır. ATPaz bağımlı olan veya ATPaz bağımlı olmayan bu taşıma sistemleri katyon veya anyonlara karşı oldukça spesifiktir (Silver 1998, Nies ve Silver 1995).

Arsenik

Yarı metal olan arsenik bir fosfat analogudur ve hücre içine girişi fosfat taşıma sistemi ile olmaktadır. Pit ve pst sistemi olmak üzere iki tip fosfat taşıma sisteminin varlığından söz edilmektedir. Pit sistemi, non-spesifik bir taşıma sistemidir ve ortamda fosfat miktarı fazla iken, arsenik Pit sistemiyle hücre içine girmektedir. Fosfat miktarı azaldığında, oldukça spesifik olan Pst sistemi indüklenmektedir. Pst sistemi fosfata karşı arsenikten 100 kat daha spesifiktir. Mikroorganizmalar Pit sistemini inaktive edip, Pst sistemini seçerek arsenik toleransını arttırabilmektedir (Silver 1998, Nies ve Silver 1995, Bruins vd 2000b).

Ayrıca ars operonu denen ve 3-5 arasında değişen sayıda gen içeren (arsR, arsA, arsD, arsB, arsC) bir operon tarafından kodlanan arsenik taşıma pompası (As(V) efflux pump) daha spesifik bir direnç sağlamaktadır (Bruins vd 2000b).

Kadmiyum

Düşük konsantrasyonlarda bile toksik olan kadmiyum nonesansiyal bir metaldir. Cd(II)'nin enzimatik detoksifikasyon ile daha toksik kadmiyum formları oluşmaktadır. Bu nedenle, Cd(II) için en önemli dirençlilik mekanizması bu metali hücre içinden dışarı pompalayan sistemdir (Bruins vd 2000b).

Farklı mikroorganizmalarda işleyiş bakımından farklılıklar gösterse de en iyi karakterize edilmiş Cd(II) dirençliliği sağlayan taşıma sistemi *S. aureus*'daki, plazmid tarafından kodlanan, cad sistemi (cadA, cadB, cadC) (Bruins vd 2000b, Silver 1992) ve *A. eutropus*'daki czc (czcA, czcB, czcC, czcD) sistemidir. Her iki operonun gen ürünleri; hücre içindeki Cd(II)'yi kendine bağlayıp yine operon tarafından kodlanan kanal proteinine taşınmakta ve operonun diğer gen ürünleri aracılığı ile de hücre dışına salınmaktadır (Bruins vd 2000b).

Bakır

Enterococcus hirae bakterisinde Cu(II) dirençliliğinden sorumlu cop operonunun bulunduğu bildirilmiştir. Bu operonun genleri Cu(II)'nin hücre içinden hücre dışına salınmasında görev alan proteinleri kodlamaktadır (Bruins vd 2000b). Bazı *Pseudomonas* suşlarında da benzer bir operon bulunduğu bildirilmiştir (Silver 1998).

Ayrıca K^+ , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , Ni^{2+} , PO_4^{3-} , SO_4^{2-} , AsO_4^{3-} , AsO_2^- , Co^{2+} , Ag^+ ve Pb^{2+} iyonlarının da taşıma sistemleri ile hücreden uzaklaştırıldığı bildirilmektedir (Silver 1998, Nies ve Silver 1995).

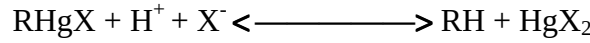
İntrasellüler ayırmda; toksik bazı metaller mikroorganizmalar tarafından üretilen sisteince zengin küçük proteinlere (metalloprotein) bağlanarak, sitoplazmada biriktirilmektedir. Bu sayede önemli hücre bileşenleri toksik metalin etkisinden korunmaktadır. Genellikle Cd(II), Cu(II) ve Zn(II)'ye karşı dirençlilikte bazı mikroorganizmalar bu yolu seçmektedir (Nies ve Silver 1995).

Pseudomonas türlerinde de sisteince zengin bir protein sentezlenmekte ve hücre içine giren toksik metaller bu proteinlere bağlanmak suretiyle bakteri toksik metallere karşı direnç kazanmaktadır. Yapılan bir çalışmada *Pseudomonas putida*'nın da metalloprotein ürettiği tespit edilmiştir (Bruins vd 2000b).

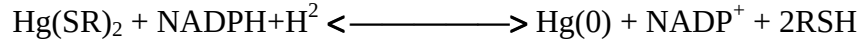
Metaller, enzimlerin ve proteinlerin yapısındaki -SH gruplarına bağlanarak bu molekülleri inaktive edebilmektedirler. Civa bu özelliğinden dolayı toksik metal olarak kabul edilmektedir. Bazı bakteri grupları civayı enzimatik detoksifikasyon ile daha az toksik hale getirmektedirler (Brown vd 2002).

Bazı bakteriler Hg(II) dirençliliği sağlayan ve bir operon (mer operonu) tarafından kodlanan gen setlerine sahiptir. Bu operon; sadece Hg(II)'yi detoksifiye etmekle kalmayıp, aynı zamanda civayı hücre dışına taşımakta ve kendi kendini regüle edebilmektedir (Brown vd 2002, Silver 1992, Silver 1998). Mer operonu, organik civa liyaz ve civa redüktaz olmak üzere iki enzim kodlamaktadır. Organik civa liyaz enzimi C-Hg bağını kırarken, civa redüktaz Hg(II)'yi Hg(0)'a (metalik civa) indirgemektedir (Silver 1992, Silver 1998, Brown vd 2002).

1- Organik civa liyaz: C-Hg bağının hidrolizinde etkilidir.



2- Civa redüktaz: Hg(II)'yi Hg(0)'a (metalik civa)'ya indirgemektedir.



Mer operonu tarafından kodlanan transport proteinleri aracılığı ile metalik civa, hücre membranından geçirilerek dışarı verilmektedir (Silver 1992, Silver 1998, Brown vd 2002).

Bacillus, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Micrococcus*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Sarcina*, *Shigella*, *Staphylococcus* ve *Streptococcus*, Hg(II)'ye karşı direnç gösteren cinsler olarak bilinmektedir (Sadhukhan vd 1997).

Gram-negatif ve Gram-pozitif bakterilerin metal iyonlarını tolere etme yetenekleri arasında farklılıklar bulunmaktadır. Yapılan bir çalışmada *Pseudomonas aeruginosa*'nın Hg, Cu, Cr ve Cd'ye karşı *B. thuringiensis*'den daha dirençli olduğu gösterilmiştir (Hassen vd 1998b).

Mikroorganizmalar bu direnç mekanizmalarından sadece birini kullanabildiği gibi birkaçını kombineli olarak da kullanabilmektedir. Bir metale karşı birden fazla direnç mekanizmasına sahip olan bir mikroorganizmanın hangi mekanizmayı seçeceği, oluşacak ara ürün veya son ürünün toksisitesine bağlıdır (Silver 1998). Normalde bugün bilinenlerden daha fazla direnç mekanizması olduğu savunulmakta fakat bu mekanizmalara sahip mikroorganizmalar henüz izole edilemediğinden ispatlanamadığı ileri sürülmektedir (Bruins vd 2000b).

Toksik metallere karşı direnç mekanizmalarının oluşmasında, mikroorganizmalarda bulunan plazmid DNA'nın kromozomal DNA'dan daha etkili olduğu belirtilmektedir (Silver 1992).

2.3. Naftalin Biyodegradasyonu

Biyodegradasyon, organik veya atık maddelerin biyolojik sistemler tarafından zararsız veya daha az zararlı yeni formlara dönüştürülmesi demektir. Bitkiler, hayvanlar, mikroorganizmalar bu biyolojik sistemleri oluşturmaktadır. Elde edilmelerinin ve yetiştirilmelerinin kolay olması, basit besi ortamında üreyebilmeleri,

kolay kontrol edilebilmeleri, gelişim sürelerinin kısa olması ve evrensel olmalarından dolayı biyolojik sistem olarak mikroorganizmalar daha sıklıkla tercih edilmektedir (Diaz 2004). Atıkların fiziksel ve kimyasal yollarla ortamdan uzaklaştırılması oldukça zor ve pahalıdır. Bu nedenle biyodegradasyon çalışmaları canlı mikroorganizmalar üzerine yoğunlaşmıştır (Li vd 2000).

Petrol ve petrol türevleri olan polisiklik aromatik hidrokarbon (PAH)'lar petrol dökülmesi ve fosil yakıtların tamamen yanmaması sonucu çevreye atılan, yaygın organik kirleticilerdir. PAH'ların çoğu çevrede uzun süre kalmaları ve birikimleri sonucu çevre kirlenmesine sebep olurlar ve biyolojik dengeyi önemli ölçüde etkilerler.

Petrol ve maden kömürünün damıtılmasıyla elde edilen naftalin ($C_{10}H_8$), havada kolayca süblimleşebilen beyaz renkli, kristal yapısında, katı ve iki benzen halkası içeren poliaromatik bir hidrokarbondur. Molekül ağırlığı 128,2 olan naftalinin erime derecesi 80, kaynama derecesi ise $218^{\circ}C$ 'dir. Naftalin suda çözünmez ancak etanol, benzen, eter ve kloroform gibi çözücülerde çözünür.

Naftalin günümüzde, tuvaletlerde kötü koku giderici olarak, elbise dolaplarından zararlı böcekleri uzak tutmak ve ferah bir koku vermesi amacıyla yanı sıra deri tabaklamak için ve böcek ilacı yapımında kullanılmaktadır. Eczacılıkta antiseptik olarak ve parfümeri de ise ara madde olarak kullanılmaktadır. Amerika'da naftalin, ilaç sanayinde, insektisit üretiminde, fitalat polimeri ve β -naftol üretiminde ara ürün olan fitalik anhidrid sentezinde kullanılmaktadır. Yine Amerika'da 1999 yılında naftalinin %59'u fitalik anhidrid sentezinde, %21'i surfaktan ve tekstil sanayinde dispersant kimyasal üretiminde, %11'i bir insektisit olan 1-naphthyl-N-methylcarbamate üretiminde, %9'u ise böcek kovucu olarak ve diğer amaçlar için kullanılmıştır. Amerikan Kimya Kurulu 2002 yılında düzenledikleri naftalin panelinde aldıkları bir kararla tabakhanelerde, tekstil sanayinde ve koku giderici deodorantların üretiminde kullanılan β -naftol üretimine kısıtlama getirmiştir (ACC 2002).

Naftaline temas etmenin ve uzun süre naftaline maruz kalmanın sağlık açısından zararları bulunmaktadır. Uzun süre ya da aşırı solunması sonucu kırmızı kan hücrelerine zarar vermektedir. Bitkinlik, halsizlik, solgun beniz gibi belirtileri olan kansızlık rahatsızlığı baş gösterebilmektedir. Ayrıca mide bulantısı baş dönmesi, kusma, bayılma, ciğerlerde hasar meydana getirebilmektedir. Gözleri de tahriş edebilmektedir. Sadece

solunum yoluyla değil temas edilmesi durumunda cilt ile de vücuda geçebilmekte ve çeşitli zararlar meydana getirebilmektedir. Bir araştırma grubu, naftalinin kanserojenik etkisini araştırmak amacıyla farelerin yaşam ortamına naftalin koymuşlar ve sonuç olarak, solunum yoluyla naftaline maruz bırakılan farelerin solumun sistemini kaplayan epitel hücrelerinde ve akciğerlerinde tümörleşme meydana geldiğini göstermişlerdir (NTP 2000). Çalışma şartlarından dolayı naftaline maruz kalan Almanyalı ve Afrikalı işçilerin gırtlak kanserine yakalandıkları rapor edilmiştir (Ajao vd 1998, NTP 2000).

2.3.1. Mikroorganizmaların biyodegradasyondaki rolü

Organik kontaminantlar, mikroorganizmalar tarafından mikrobiyal transformasyona uğratılmaktadır. Karbon kaynağı ve elektron verici olmak üzere mikroorganizmalar kontaminantları iki amaç için kullanmaktadır (Diaz 2004).

Yapılan çalışmaların çoğunda *Achromobacter*, *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Flavobacterium*, *Nocardia* ve *Pseudomonas* cinslerine ait türlerin karasal ve sucul alanlardaki hidrokarbonları degrade edebildiği rapor edilmiştir (Lehay ve Colwell 1990).

Mikroorganizmaların biyodegradatif özelliklerinin kaynağının kromozomal DNA, plazmid DNA veya transpozonlar üzerinde taşınan genler olduğu rapor edilmiştir (Kotsal vd 1998). Yapılan bir çalışmada *Pseudomonas* suşlarının biyodegradasyon özelliklerinin plazmid DNA kaynaklı olduğu belirtilmiştir (Bruins vd 2000a). Transpozonlar, kromozomal DNA-plazmid DNA veya plazmid DNA-plazmid DNA arasında zıplayabilen gen parçalarıdır. Bakterilere biyodegradatif özelliğin yanısıra antibiyotik dirençliği gibi bazı avantajlar da sağlamaktadır.

Bakteriler, doğal yaşam ortamlarında kirleticileri enerji ve karbon kaynağı olarak kullanabilme yeteneğine sahiptirler. Ancak mikroorganizmaların degradatif özelliği çevre şartlarından etkilenmektedir. Bu nedenle kirliliğe sebep olan maddelerin daha etkili bir şekilde uzaklaştırılabilmesi için zorlu çevre şartlarında gelişimini sürdürebilen ve çok çeşitli substratları kullanabilen organizmaların elde edilmesine çalışılmaktadır (Bruins vd 2000a, Diaz 2004).

Yapılan bir çalışmada, tek karbon kaynağı olarak toluen kullanılarak izole edilen *Pseudomonas* sp. D8'in atık sudaki toluen varlığında benzen ve diğer aromatik bileşikler

degrade edebildiği gösterilmiştir (Chang vd 1997). Benzer bir çalışmada petrol ile kirletilmiş alanlardan izole edilen *Pseudomonas* suşlarının karbon sayısı 5-8 olan alkanları, tolueni ve naftalini kullanabildiği gösterilmiştir (Whyte vd 1997). Antartika’da jet uçaklarının yakıtıyla kirlenmiş alandan tolueni tek karbon kaynağı olarak kullanabilen *Pseudomonas putida* suşları izole edilmiştir (Farrell vd 2003).

Ağır metal iyonları mikroorganizmaların degradatif özelliğini etkileyen önemli bir faktördür. Genellikle düşük konsantrasyondaki metal iyonları mikroorganizmaların biyolojik parçalama kabiliyetini stimüle edebilirken, yüksek konsantrasyonda inhibe etmekte hatta bakteri üzerinde toksik etki yaratabilmektedir. Bazı bakteri türleri metal iyonlarına karşı direnç mekanizmaları geliştirmiştir ve bu sayede metal iyonlarının varlığında biyodegradatif özelliklerini koruyabilmişlerdir (Bruins vd 2000b, Filali vd 2000). Ortam pH’sının da biyodegradasyonu etkilediği belirtilmiştir (Sandrin ve Maler 2003).

2.4. *Pseudomonas* cinsinin genel özellikleri

2.4.1. Habitatları

Pseudomonas’lar toprak, su ve çürümekte olan organik maddelerde bulunan mikroorganizmalardır. Bu ortamlar dışında sulak alanlarda yetiştirilen tarım ürünlerinde, lağım çukurlarında, tuvaletlerde, hastane ortamı ve hastanelerde kullanılan temizlik maddelerinde, solunum ve diyaliz cihazlarında ve hatta dezenfeksiyon solüsyonlarında bile bulunurlar (Carson vd 1973).

Yapılan çalışmalarda nehir suyundan *Pseudomonas spinosa*, distile sudan *Pseudomonas huttiensis*, *Pseudomonas cepacia* ve *Pseudomonas lanceolata* türleri izole edilmiştir (Carson vd 1973, Vachee vd 1997).

Çeşitli bitkilerden de izole edilen *Pseudomonas* türleri bulunmaktadır. Çavdar, zeytin, fasulye, leylak, patates ve şeker pancarından *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas syringae* ve *Pseudomonas aeruginosa* suşları izole edilmiştir (Hirano ve Upper 2000).

Ayrıca deniz kaplumbağasının (*Caretta caretta* L.) derisinden *Pseudomonas fluorescens* izole edilmiştir (Cabanes vd 1997). Sadhukhan vd (1997), balık

solungacından ve midesinden *Pseudomonas* türlerini izole etmişler ve bakterinin HgCl₂'ye dirençli olduğunu bildirmişlerdir.

Pseudomonas'ların geniş bir yayılım göstermeleri çok basit gelişim ihtiyaçlarına gereksinim duymalarındandır. Minimal besin varlığında 4-43°C gibi geniş bir sıcaklık aralığında gelişebilirler. Cinsin bir çok türünün gelişme gösterdiği optimum sıcaklık 30°C'dir. Türlerin tamamı nötral veya alkali pH (7.0-8.5) aralığında daha iyi gelişmektedir (Cowan vd 1974).

2.4.2. Morfolojisi ve hücre yapısı

0,5-1,0×1,5-5,0 µm boyutunda düz veya hafif eğimli basillerdir. *Pseudomonas* suşlarının, mikroskopik görünüşleri nadiren büyük ve şekil olarak normalden çok farklı olabilirler. Bazı türlerin hücreleri oval şekilli olabilirken bazı bitki patojenlerinin hücreleri 4 µm'den daha uzundurlar. Sahip oldukları bir veya birden fazla polar flagella ile hareket ederler. Hareket için gerekli olan enerjiyi aerobik metabolizmadan sağlarlar. Nadiren hareketsiz olan *Pseudomonas* suşları da mevcuttur (Cowan vd 1974).

2.4.3. Pigmentasyon

Pigmentasyon, bakteriler tarafından renkli koloni üretimi veya besiyeri yüzeyine pigment salgılanması olup pigment üreten *Pseudomonas* türlerinin ayırımında kullanılan önemli bir özelliktir (Keskin ve Ekmekçi 2003). *Pseudomonas*'lar tarafından üretilen pigmentlerin antibiyotik ve bakteriyosin özelliğine sahip olduğu belirtilmiştir (Vachee vd 1997). Bakteriyel pigmentler sekonder metabolitlerden olup, optimum şartları çok değişken olmakla birlikte, gelişme sıcaklığı, ortamı ve besiyeri içeriklerine bağlı olarak farklı renklerde oluşturulurlar (Kanner vd 1978). Hassen vd (1998b), çalışmalarında kullandıkları *Pseudomonas* cinsine ait türlerin, çinko varlığında piyoverdin pigmentini daha fazla sentezlediklerini ve çinkonun pigment üretimini arttırdığını göstermişlerdir (Hassen vd 1998b).

Pseudomonas aeruginosa, *P. putida*, *P. fluorescens*, *P. chlororaphis*, *P. syringae*, *P. cichorii* gibi türler, düşük demir içerikli besiyerlerinde bol miktarda fluoresans pigmentleri üretmektedirler (Meyer ve Hohnadel 1990, Vachee vd 1997). Günümüzde King A (*Pseudomonas* Agar F) ve King B (*Pseudomonas* Agar P) gibi spesifik besiyerleri kullanılarak *Pseudomonas* cinsine ait türlerinin fluoresans pigmentleri üretilip

üretmedikleri tespit edilebilmektedir (Vachee vd 1997, Keskin ve Ekmekçi 2003). *P. fluorescens*'in King B besi ortamında flouresin ürettiği bildirilmiştir (Baumann vd 1972).

Fenazinler *Pseudomonas*'ların suda çözünebilir pigmentleridir. Suda çözünen pigmentler içinde en çok bilinenleri pyoverdin ve pyocyanindir. Diğer fenazin pigmenti ise, özellikle *P. chlororaphis* için karakteristik olan, suda diğer pigmentlere kıyasla daha az çözünebilir ve koloni etrafında kristalize olma özelliğine sahip yeşil bir pigment olan klororafin (chlororaphin)'dir (Kanner vd 1978).

Lemonnierin *P. lemonnierin* suşu için karakterize olan hücre içinde bulunan çözünmeyen bir pigmenttir (Fuller ve Mellows 1971).

Karotenoidler genellikle sarı veya turuncu renkli, suda çözünmeyen ve *P. alcaligenes*, *P. mendocina*, *P. versicularis*, *P. flava*, *P. pseudoflava*, *P. palleronii*, *P. rhodos*, *P. echinoides*, *P. radora* gibi birçok tür tarafından üretilen pigmentlerdir (Fuller ve Mellows 1971).

Yaşlı *Pseudomonas* kültürlerinde (10 günlük) melanin pigmentlerinin üretildiği de tespit edilmiştir (Hassen vd 1998b).

2.4.4. Gelişme ortamları ve fizyolojik özellikleri

Pseudomonas'ların birçok türü amonyum iyonları veya nitrat ile enerji veya karbon kaynağı olarak tek bir organik madde içeren çok basit mineral besiyerlerinde gelişebilmektedir (Baumann vd 1972). Virülans faktörü olarak hemolizine sahip olan *P. aeruginosa* suşları kanlı besiyerlerinde hemoliz oluştururlar. Glukoz ve bazı karbohidratları oksidasyon yolu ile parçalayıp asit oluştururlar. Laktoz ve sukroza etki etmezler. İndol ve H₂S oluşturmazlar. Metil kırmızısı ve Voges proskauer testleri negatiftir. Kemoorganotrofik türleri fakültatif kemolitotrof olup enerji kaynağı olarak hidrojen ve karbonmonoksiti kullanabilirler. Çoğunluğu aerobik olup bazı türleri nitratı kullanarak anaerobik olarak gelişebilir. Üreyi amonyak haline ya da amonyağı üreye çevirebilirler ve bunları azot kaynağı olarak kullanabilirler. Çoğu asidik ortamlarda gelişemezler. Oksidaz pozitif veya negatif olabilirler. Katalaz pozitif olup lizin ve ornitini dekarboksile etmezler. *Pseudomonas* türlerinin tek karbon kaynağı içeren basit besiyerlerinde gelişebilme yetenekleri karakterizasyon yapılması için temel

oluşturmaktadır. Bu organik bileşiklerin sayı ve tiplerinin değiştirilmesi ile gelişmeyi sağlayan bileşikler tespit edilerek, sabit kimyasal içerikli besiyerlerine bu bileşiklerin ilavesi ile izole edilen türlerin tanımlanmasına önemli katkılar sağlanmıştır (Cowan vd 1974).

2.4.5. Antimikrobiyal ajanlara dirençlilik

Bakteriler antimikrobiyal maddelere karşı çeşitli direnç mekanizmaları geliştirmişlerdir. Antibiyotikler bakteri tarafından enzimatik inaktivasyona uğratarak veya parçalanarak, toksik etkisi yok edilmektedir. Buna en iyi örnek β -laktam halkasına sahip antibiyotiklere karşı gösterilen dirençliliktir. Örneğin penisilin, penisilinaz enzimi ile hidroliz edilmektedir (Hancock ve Speert 2000). Kloramfenikol antibiyotiği, asetil transferaz enzimi ile kloramfenikolün hidroksil grubu asetillenerek inhibe edilmektedir. Bu durumda antibiyotik, ribozomun 50S'lik alt birimine bağlanamamakta ve böylece bakterinin protein sentezi devam etmektedir (Silvia 1996). Aminoglikozidler, ribozomun 30S'lik küçük alt birimine bağlanırlar ve mRNA'nın okunmasını bozarak protein sentezini önlerler. Bu antibiyotiklere dirençli olan bakteriler, aminoglikozid grubu antibiyotikleri N-asetilasyon, O-adenilasyon veya O-fosforilasyona uğratarak yapısını değiştirebilmektedirler (Silvia 1996).

Antibiyotiğin etki ettiği hedef bölgenin değiştirilmesi ile de direnç sağlanabilmektedir. Hedef bölgede bulunan aminoasidin değiştirilmesiyle, antibiyotiğin hedef bölgeye olan ilgisi azaltılmaktadır. Örneğin penisilin, penisilin bağlayan proteinlere (PBP) geri dönüşümsüz olarak bağlanmakta ve böylece peptidoglikan sentezi inhibe edilmektedir. Penisilin bağlandığı bu hedef bölge (PBP)'de meydana getirilen değişiklik sonucu antibiyotik bağlanamamakta ve direnç sağlanmaktadır. Ribozomlarda meydana getirilen değişiklikler sonucunda da eritromisin ve tetrasiklin antibiyotiklerinin etkisi azaltılmaktadır (Silvia 1996).

Antibiyotiğin hücre içine girişi engellenerek toksik etkisine karşı direnç sağlanmaktadır. Hücre membranı, antibiyotiğin hücre içine girişini engelleyen bir bariyer görevi yapmaktadır. Gram pozitif bakterilerin sahip oldukları kalın peptidoglikan tabakası, gram negatiflerde bulunan dış membrana göre koruyuculuğu daha fazladır. Ancak gram pozitif bakterilerin çeşitli toksik maddelere karşı daha duyarlı olduğu belirtilmiştir. Dış membranda bulunan porinlerin (kanal proteinleri)

sayısında ve lipopolisakkarit miktarında meydana getirilen değişiklikler, bir bariyer görevi yapan membranın geçirgenliğini etkilemekte ve antibiyotiğe karşı dirençlilik sağlanabilmektedir (Hancock and Speert 2000). *E. coli*'nin dış hücre membranında madde taşınımını sağlayan OmcA, OmpC ve OmpF (porinler) bulunmaktadır. Sefalosporin içeren besiyerinde geliştirildiğinde hücre membranındaki porin sayısının azaldığı ve antibiyotiğin hücre içine girişinin önlendiği belirtilmiştir (Silvia 1996, Li vd 1997).

Hücre içine giren antibiyotik, aktif olarak hücre dışına atılarak sitoplazmadaki konsantrasyonu azaltılmakta ve direnç sağlanmaktadır (Hancock and Speert 2000). Membranda bulunan birçok integral proteinin, hücreye giren antibiyotikleri aktif olarak hücre dışına pompalamasından sorumlu olduğu bildirilmiştir. Çoklu ilaç dirençliliği (Multi drug resistance- MDR) ve Spesifik ilaç dirençliliği (spesific drug resistance- SDR) gibi çeşitli mekanizmalar sayesinde bakteriler toksik bileşiklerden korunabilmektedir (Hancock and Speert 2000).

Pseudomonas türlerinin çoğu antimikrobiyal ajanlara dirençlidirler. Antibiyotik ve ilaç duyarlılığı çalışmaları, yeni türlerin açıklanmasını sağlayabilecek kadar önemli ve faydalı çalışmalardır (Hancock and Speert 2000).

Birçok antimikrobiyal ajana karşı dirençli olmasına rağmen *Pseudomonas* enfeksiyonlarına karşı kullanılan antibiyotikler de mevcuttur. En önemli gruplar aminoglikozidler (gentamisin ve tobramisin gibi), yarısentetik penisilinler (karbenisilin, tikarsilin ve piperasilin gibi) üçüncü kuşak sefalosporinler (seftazidim ve sefoperazon gibi) quinolonlar (siprofloksasin) ve karbepenemlerdir (meropenem ve imipenem) (Hancock and Speert 2000).

β -laktam antibiyotiklerden olan karbenisillin dirençliliği, plazmid DNA üzerinde taşınan genlerde kodlanan β -laktamazlardan kaynaklanmaktadır. Yapılan çalışmalarla bu plazmidlerin enterik bakterilerden transfer olabileceği gösterilmiştir. Plazmidlere bağlı antibiyotik dirençliliği, patojen *Pseudomonas*'ların sebep olduğu enfeksiyonların tedavisinde ve bu plazmid DNA'ların diğer patojen grup bakterilere transfer olabilmesi açısından da önemlidir (Hancock ve Speert 2000).

Floroquinolonlar birçok gram negatif bakteri üzerinde ekilidirler. Bu antibiyotikler DNA gyrase enzimini inhibe ederek hücre bölünmesini durdurmaktadır (Algun vd 2004).

2.4.6. Plazmid DNA

Pseudomonas'lar antibiyotiklere, metallere, antibakteriyel ajanlara, bakteriofajlara, bakteriosinlere, fiziksel ajanlara karşı dirençlilik sağlayan ve farklı metabolik özellik kazandıran, plazmidlerce taşınan genler bakımından oldukça zengindirler. Plazmidlerin bazıları gelişme şartlarında rol alırken, bazıları çeşitli ajanlara (R plazmidleri) karşı dirençliliğe, bazıları daha önce kullanılmamış karbon kaynaklarını kullanabilme kapasitesine etki ederler (Bruins vd 2003). Böylece bu cinsin üyelerine çok yönlü fayda sağlamış olur. Son zamanlarda *Pseudomonas* cinsine ait birçok plazmid yapısı açıklanmıştır. En iyi bilineni bazı *P. putida* suşlarında bulunan TOL adındaki katabolik plazmid olup toluen, ksilen ve benzer aromatik bileşikler varlığında gelişme yeteneğini kodlamaktadır (Silver 1992).

2.4.7. Antimikrobiyal Aktivite

Pseudomonas'lar bazı antimikrobiyal bileşikler üretseler de antibiyotik üretimi bakımından zayıftırlar. *P. fluorescens*'in pseudominik asit ve *P. pyrracinia* kültürlerinin de pyrrolnitrin ürettiği bilinmektedir. Yapılan çalışmalarla toprak veya bitkilerin rizosferlerinde bulunan bazı *Pseudomonas* türlerinin antagonistik aktivitesi olduğu gösterilmiştir. Tarım yapılan topraktan izole edilen *Pseudomonas* sp. (NJ-101)'nin bir bitki patojeni olan *Fusarium* cinsinin farklı türlerine karşı antifungal aktivitesinin olduğu bildirilmiştir (Bano ve Musarrat 2004).

Pseudomonas'ların bitkiler üzerine yararlı etkileri, bitki için patojen olan organizmalara karşı üretmiş oldukları antimikrobiyal bileşiklerle sınırlı olmayıp, bazı *Pseudomonas* türleri bitki gelişimine de olumlu etkide bulunmaktadır. Örneğin bazı *Pseudomonas* suşlarının bitki gelişimini stimüle eden IAA (indol asetik asit) ürettiği de tespit edilmiştir (Bano ve Musarrat 2004, Torres-Rubio vd 2000).

Yapılan bir çalışmada, flouresans *Pseudomonas*'lardan olan, *P. fluorescens* AH2 suşunun *Aeromonas salmonicida* üzerinde 21 mm'lik inhibisyon zonu oluşturduğu tespit edilmiştir. *Aeromonas salmonicida*'nın bir balık türü olan *Salmo salar* üzerinde

patojen etkisi olduğu bilinmektedir. Bu nedenle balıkların yetiştirildiği havuzlara probiyotik aktiviteye sahip olan *P. fluorescens* AH2 suşu ilave edilerek balıkların iyileştirilebileceği düşünülmüştür. Bu çalışmanın, henüz in vivo olarak denenmediği belirtilmiştir (Gram vd 2001).

Vachee (1997) ve arkadaşları mineral sudan izole ettikleri *Pseudomonas* suşlarının *Aeromonas* suşları üzerine antagonistik etkide bulunduğunu Enterobacteriaceae familyasına ait üyeler ve bazı gram pozitif bakterilere karşı ise etkisiz olduğunu göstermişlerdir.

2.4.8. Lipolitik ve proteolitik enzim üretimi

Lipazlar ve proteazlar en önemli endüstriyel enzim gruplarını oluşturmaktadır. Bu enzimler gıda sanayi, deterjan, kimya endüstrisi, biyotıbbi bilimler gibi çok geniş kullanım alanına sahip enzimlerdir. Son zamanlarda fungal ve bakteriyel enzim eldesi biyoteknolojide büyük ilgi görmektedir. Lipaz üreten organizmalar arasında *Candida*, *Geotrichum*, *Rhizopus* ve *Thermomyces* cinsleri büyük önem görürken, bakteri grupları arasında ise *Pseudomonas* cinsi bakterilerin önem taşıdığı bildirilmiştir. Yapılan bir çalışmada izole edilen tüm *Pseudomonas* suşlarının lipaz ürettiği rapor edilmiştir (Arpigny ve Jaeger 1999).

Yapılan başka bir çalışmada ise sıcaklık, pH ve kalsiyum konsantrasyonuna bağlı olarak bazı *Pseudomonas* suşlarının proteaz ürettiği belirlenmiştir (Hoshino vd 1997).

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

3.1.1. İzolasyon kaynakları

Çeşitli kaynaklardan aseptik koşullara uygun olarak alınan 9 adet su ve 12 adet toprak örnekleri steril vida kapaklı renkli şişelerde ve kaplumbağa yuvalarından alınan 2 adet embriyonlu yumurtalar aseptik şartlara uyularak steril kaplarda +4°C’de muhafaza edilmiştir. Bakterilerin izole edildiği kaynaklar ve bölgeler Tablo 3.1’de verilmiştir.

Tablo 3.1 Bakterilerin izole edildiği kaynaklar ve bölgeler

Bakteri kodu	İzole edildiği Kaynak	İzole Edildiği Bölge
P1	Toprak	Aliağa Petrol Rafinerisi / İzmir
P4	Toprak	Aliağa Petrol Rafinerisi / İzmir
P8	Su	Aliağa Petrol Rafinerisi / İzmir
P14	Toprak	Karagöl / Denizli
P15	Toprak	Karagöl / Denizli
P16	Kaplumbağa Yumurtası	Dalaman / Muğla
P18	Kaplumbağa Yumurtası	Dalaman / Muğla
P19	Su	Arıtım Tesisi / Denizli
P22	Su	Arıtım Tesisi / Denizli
P26	Su	Korucuk / Denizli
P27	Su	Güzelköy / Denizli
P29	Su	Güzelköy / Denizli
P33	Su	Güzelköy / Denizli
P34	Toprak	Güzelköy / Denizli
P37	Toprak	Sığma / Denizli
P39	Su	Korucuk / Denizli
P40	Su	Korucuk / Denizli
P41	Toprak	Zeytinyağı Fabrikası / Aydın
P43	Toprak	Zeytinyağı Fabrikası / Aydın
P44	Toprak	Zeytinyağı Fabrikası / Aydın
P45	Toprak	Zeytinyağı Fabrikası / Aydın
P46	Toprak	Zeytinyağı Fabrikası / Aydın
P52	Toprak	Zeytinyağı Fabrikası / Aydın

3.1.2. Araştırmada kullanılan besiyerleri ve kimyasal malzemeler

Nutrient Broth (NB)

Peptone (Lab M)	5 g
Yeast extract (Merck)	2 g
Meat extract (Merck)	1 g
Sodyum klorür (Merck)	5 g
Distile su	1000 ml

6 N NaOH ve 6 N HCl kullanılarak pH 6,8'e ayarlanmış ve 121°C'de 15 dk sterilize edilmiştir.

NB besiyeri, bakterilerin aktifleştirilmesi ve gelişim gösterdikleri optimum sıcaklık, pH ve tuz konsantrasyonunun belirlenmesi için kullanılmıştır. Ayrıca NB besiyerinde aktifleştirilen bakteri kültürlerine 1/3 oranında gliserol (Merck) ilave edilerek -20°C'de muhafaza edilmiştir. NB besiyerine 15 g/ml agar (Merck) ilave edilerek Nutrient Agar (NA) besiyeri elde edilmiştir. NA besiyeri bakterilerin koloni morfolojilerinin belirlenmesi, stoklanması, ağır metal dirençliliğinin ve antibiyotik duyarlılığının tespitinde kullanılmıştır.

MacCONKEY Agar (Merck)

50 gr besi ortamı 1000 ml distile suda çözülmüş ve pH'sı 7,1±0,2'ye ayarlandıktan sonra 121°C'de 15 dk sterilize edilmiştir. Bu besiyeri *Pseudomonas* izolasyonu için kullanılmıştır.

Cetrimide Agar (*Pseudomonas* Selective Agar Base, Merck)

44,5 gr besi ortamı 1000ml distile suda çözülür ve üzerine 10 ml gliserin ilave edildikten sonra pH'sı 7,2±0,2'ye ayarlanıp 121°C'de 15 dk sterilize edilmiştir. Bu besiyeri seçici ve ayırteci bir besi ortamı olup, *Pseudomonas* izolasyonu için kullanılmıştır.

Skim Milk Agar

Skim milk powder (Fluka) 105°C’de 15 dk sterilize edildikten sonra son konsantrasyonu %10 olacak şekilde, önceden steril edilen ve soğutulan NA içerisine aktarılmıştır. Bu besiyeri izolatların proteolitik aktivitelerinin belirlenmesi için kullanılmıştır.

Tribütirin Agar

Pepton from meat (Merck)	2,5 gr
Pepton from casein (Merck)	2,5 gr
Yeast extract (Merck)	3 gr
Tribütirin (Merck)	10 ml
Agar (Merck)	15 gr
Distile su	1000 ml

pH 7,5±0,2’ye ayarlanmış ve 121°C’de 15 dk sterilize edilmiştir. İzolatların lipolitik aktivitelerinin belirlenmesi için kullanılmıştır.

Kanlı Agar

%5 oranında koyun eritrositi içeren besi ortamı kullanılmıştır. İzolatların hemolitik aktivitelerinin belirlenmesi amacıyla kullanılmıştır.

YEPD Broth

Pepton (Merck)	2 gr
Yeast ekstrakt (Merck)	1 gr
Glukoz (Riedel)	2gr

Hidrojen Peroksit (H₂O₂) (Merck)

%37’lik H₂O₂’den %3’lük H₂O₂ hazırlanmış ve bakterilerin katalaz aktivitesinin belirlenmesi için kullanılmıştır.

3.1.3. API 20NE identifikasyon kiti (Biomerieux)

API 20NE sistemi Enterobacteriaceae familyası dışındaki gram negatif cinslerin (*Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Flavobacterium*, *Moraxella*, *Vibrio*, *Aeromonas* vb.) identifikasyonu için hazırlanmış, 8 geleneksel ve 12 asimilasyon testini içeren standardize edilmiş bir mikro metot sistemidir. API 20NE veritabanı *Brucella* ve *Francisella* gibi gelişimleri için özel besinleri ve ön uyarıları gerektiren cinsleri kapsamamaktadır. Böyle türlerin varlığında ekstra deneylerin ve doğrulama testlerinin yapılması gerekmektedir.

API 20NE stripleri kurutulmuş besiyeri ve substrat içeren 20 mikrotüpten oluşmaktadır. Saf bakteri kolonilerinden, steril serum fizyolojik içeren tüplerde süspansiyonları hazırlanarak bu mikrotüplere inoküle edilmiştir. İnkübasyon esnasında metabolizma sonucu kendiliğinden veya ayıraçlara bağlı olarak renk değişikliğine sebep olmaktadır. Asimilasyon testleri için ise AUX besiyeriyle karıştırılarak inoküle edilen bakteriler eğer substratı kullanabilirlerse gelişebilmektedir.

API 20 NE Test Kitini Oluşturan Öğeler :

- 25 API 20NE stripi
- 25 İnkübasyon kutusu
- 25 ampul API 20NE (AUX) besiyeri
- 25 adet sonuç tablosu
- Mineral yağ
- McFarland standart sıvısı

AUX Medium içeriği:

- Amonyum sülfat 2 g
- Agar 1,5 g
- Mineral base 82,8 mg

- Amino asit 250 mg
 - Vitaminler ve diğer 35,9 mg
 - Fosfat buffer 0,04 M
 - Distile su 1000 ml
- pH : 7,1

Stripler ve API 20NE (AUX) Medium 2-8°C arasında buzdolabında muhafaza edilmiştir.

API 20NE Kitinde bulunan Ayıraçlar ve İçerikleri

<u>James</u>	J 2183 bileşiği	0,5 g
(5 ml)	HCl (1 N)	100 ml
<u>NIT 1</u>	Sülfanilik asit	0,4 g
(5 ml)	Asetik asit	30 g
	H ₂ O	70 ml
<u>NIT 2</u>	N,N-dimetil-1-naftilamin	0,6 g
(5 ml)	Asetik asit	30 g
	H ₂ O	70 ml
<u>Zn</u>	Çinko tozu	10 g

NIT 1 ve Zn ayıraçları oda sıcaklığında, James ve NIT 2 ayıraçları ise 2-8°C arasında karanlık bir ortamda buzdolabında muhafaza edilmiştir. Bu ayıracın normal rengi sarıdır ve uzun süreli olarak buzdolabı dışında tutulması sakıncalıdır. Pembe renk oluşması bu ayıracın bozulmasına işaret eder. API 20NE striplerindeki reaksiyonlar ve sonuçları Tablo 3.2’de verilmiştir.

Tablo 3.2 API 20NE okuma tablosu

Test	Substrat	Reaksiyon / Enzimler	Sonuç	
			Negatif	Pozitif
NO₃	Potasyum Nitrat	Nitratın nitrite redüksiyonu	NIT 1 + NIT 2 / 5 dk	
			Renksiz	Pembe Kırmızı
		Nitratın nitrojene redüksiyonu	Zn / 5 dk	
			Pembe	Renksiz
TRP	Triptofan	İndol Üretimi	James / hızlı reaksiyon	
			Renksiz -Açık yeşil - Sarı	Pembe
GLU	Glukoz	Asidifikasyon	Mavi –Yeşil	Sarı
ADH	Arginin	Arginin dihidrolaz	Sarı	Turuncu Pembe Kırmızı
URE	Üre	Üreaz	Sarı	Turuncu Pembe Kırmızı
ESC	Eskülin	Hidroliz (β -glukosidaz)	Sarı	Gri Kahve Siyah
GEL	Jelatin	Hidroliz (Proteaz)	Pigment difüzyonu yok	Siyah pigment difüzyonu
PNPG	p-nitrofenil- β -D-galaktopiranosit	B-galaktosidaz	Renksiz	Sarı
GLU	Glukoz	Asimilasyon	Şeffaf	Opak
ARA	Arabinoz	Asimilasyon	Şeffaf	Opak
MNE	Mannoz	Asimilasyon	Şeffaf	Opak
MAN	Mannitol	Asimilasyon	Şeffaf	Opak
NAG	N-asetil glukozamin	Asimilasyon	Şeffaf	Opak
MAL	Maltoz	Asimilasyon	Şeffaf	Opak
GNT	Glukonat	Asimilasyon	Şeffaf	Opak
CAP	Kaprat	Asimilasyon	Şeffaf	Opak
ADI	Adipat	Asimilasyon	Şeffaf	Opak
MLT	Malat	Asimilasyon	Şeffaf	Opak
CIT	Sitrat	Asimilasyon	Şeffaf	Opak
PAC	Fenil-asetat	Asimilasyon	Şeffaf	Opak
OX	Oksidaz	Sitokrom oksidaz	Renksiz	Koyu mavi Mavi

3.2. Metot

3.2.1. Bakterilerin izolasyonu

Araştırmada kullanılan toprak ve su örnekleri steril şartlar altında 1 gr veya 1 ml olmak üzere 9 ml steril fizyolojik suya ilave edilerek iyice karıştırılmış ve 10^{-1} - 10^{-6} şeklinde seri dilüsyonlar gerçekleştirilmiştir. Her bir dilüsyondan 0,1 ml alınarak MacCONKEY Agar besiyerine inoküle edilmiştir. Örnekler steril drigalski spatülü ile besi ortamı yüzeyine homojen şekilde yayılmıştır. Petriler $37\pm 0,1^{\circ}\text{C}$ 'de 24-48 saat inkübe edilmiştir. Üreme gösteren bakterilerden şeffaf renkli küçük koloniler seçilerek Cetrimide Agar besiyerine aktarılmıştır. Petriler, 24-48 saat $37\pm 0,1^{\circ}\text{C}$ 'de inkübe edilmiş ve besiyeri yüzeyinde gelişen bazı koloniler seçilerek gram boyama yapılmıştır. Hazırlanan preparatlar mikroskop altında incelenerek, gram negatif ve çubuk şeklinde olan bakteriler seçilmiştir (Malik ve Jaiswal 2000, Jensen vd 2001).

3.2.2. İzole edilen suşların muhafazası

İzole edilen suşlar, 121°C 'de 15 dakika sterilize edilmiş Nutrient Agar içeren tüplerde $+4^{\circ}\text{C}$ 'de muhafaza edilmiştir.

3.2.3. Bakterilerin tiplendirilmesi

İzolatların tür düzeyinde tiplendirilmeleri, enterik olmayan gram negatif basiller için spesifik olan biyokimyasal test kiti (API 20NE) ile yapılmıştır (Vachee vd 1997, Richard ve Vogel 1999, Wang ve Jayarao 2001).

Bu amaçla nutrient broth besiyerinden saf kültürler nutrient agar besiyerine ekilerek aktif hale getirilmişlerdir. Bu petrilerden öze kullanılarak 1–4 koloni daha önceden kullanıma hazırlanmış 2 ml'lik %0,85'lik steril serum fizyolojik tüplerine inoküle edilmiş ve steril mikropipetler kullanılarak 0,5 McFarland bulanıklılığında homojen bir süspansiyon hazırlanmıştır. Bu süspansiyondan aynı pipetle NO_3 testinden PNPG testine kadar hava kabarcığı kalmayacak şekilde sadece tüp kısımlarına inokülasyon yapılmıştır. Daha sonra bu süspansiyondan 200 μl AUX Medium'a eklenerek hava kabarcığı oluşturmayacak şekilde karışım sağlanmıştır ve bu karışım kalan GLU testinden PAC testine kadar hem tüp hem de kuyu kısımları dolacak şekilde inoküle

edilmiştir. Kuyu kısımlarının konveks ya da konkav olmaması, düz bir şekil alması sağlanmıştır. Daha sonra GLU, ADH ve URE testleri için anaerobik ortam sağlamak amacıyla mikrotüplerin kuyu kısımları konveks menisküs şeklinde mineral yağ ile doldurulmuştur.

Bir tabla ve bir kapaktan oluşan inkübasyon kaplarında nemli bir ortam sağlamak amacıyla 5 ml distile su petekli yapıdaki tablaya dağıtılmıştır. Mikrotüplerden oluşan stripler bu tablalara yerleştirilerek kapakları kapatılmıştır. Suş numaraları inkübasyon kutularına yazılarak suşların karışması önlenmiş ve $30\pm0,1^{\circ}\text{C}$ 'de 24 ve 48 saat inkübe edilmiştir.

İnkübasyon sonunda GLU, ADH, URE, ESC, GEL ve PNPG test sonuçları kaydedilmiştir. NO_3 testi için ise önce NIT 1 hemen ardından NIT 2 ayıraçları damlatılarak 5 dk beklenmiş, eğer sonuç negatif ise 2–3 mg Zn tozu eklenerek 5dk sonra tekrar sonuç alınmıştır. TRP testi için kuyucuğa bir damla James ayırıcı damlatılarak reaksiyon sonucu hemen kaydedilmiştir. Asimilasyon testlerinde ise kuyu kısmında opak renk görülmesi bakteriyel gelişmenin pozitif olduğunun göstergesidir. 24 saatlik inkübasyon sonunda yapılan bu işlemlerin ardından ayıraç eklenen test tüpleri mineral yağ ile kapatılarak 24 saat daha inkübe edilmiş ve 48 saat sonunda sonuçlar tekrar kaydedilmiştir. Reaksiyon sonuçları Tablo 3.2'ye göre okunmuş ve sonuçlar sonuç çizelgelerine kaydedilmiştir.

Sonuç çizelgelerinde testler 3 testlik gruplar halinde ayrılmışlar ve gruptaki testler 1, 2 ve 4 sayılarını kodlayacak şekilde numaralandırılmıştır. 21.test oksidaz testi olup 4 sayısı ile kodlanmıştır. Her grup içindeki sonuçlara bağlı olarak ortaya 7 haneli bir sayı ortaya çıkmaktadır. Elde edilen 7 haneli sayılara karşılık gelen bakteri suşlarının adları bilgisayar programı ile belirlenmiştir.

3.2.4. İzolatların hemoliz özelliklerinin belirlenmesi

İzolatların hemolitik özelliklerinin belirlenmesi amacıyla %5 koyun eritrositi içeren Kanlı Agar besiyeri kullanılmıştır. NB'de aktifleştirilip yoğunluğu 0,5 McFarland ($1,5\times10^8$ hücre/ml) bulanıklık tüpüne göre ayarlanan bakteri kültürlerinden Blood Agar Base içeren petrilere çizgi ekim yapılmıştır. 37°C de inkübe edilerek 24 ve 48 saatlik inkübasyon sonunda kolonilerin etrafında meydana gelen zonun tipine göre sonuçlar değerlendirilmiştir (Castro-Escarpulli vd 2003).

3.2.5. İzolatların katalaz aktivitelerinin belirlenmesi

İzolatların katalaz aktivitesini test etmek amacıyla bakteriler 5 ml'lik steril Nutrient Broth besiyerine %1 oranında aşılanmış ve $37\pm0,1^{\circ}\text{C}$ 'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda kültürler üzerine %3'lük H_2O_2 ilave edilip gaz oluşumu kontrol edilmiştir (Temiz 2000).

3.2.6. İzole edilen *Pseudomonas* suşlarının gelişim gösterdikleri optimum koşulların belirlenmesi

Farklı tuz konsantrasyonları, pH ve sıcaklık değerlerinin izolatların gelişimleri üzerine etkileri araştırılmıştır. Bu amaçla; %0,5; %1,0; %1,5; %2,0; %3,0 ve %4,0 oranında NaCl içeren ve pH değeri 6,8'e ayarlanan Nutrient Broth besiyeri tüplere 5'er ml olacak şekilde paylaştırılmıştır. pH' nın etkisini gözlemleyebilmek için pH'sı 5,5; 6,0; 6,5; 7,0; 7,5; 8,0; 8,5 ve 9,0 olan %0,5 oranında NaCl içeren 5'er ml'lik Nutrient Broth besi ortamları kullanılmıştır. Sıcaklığın etkisini ölçmek amacıyla %0,5 oranında NaCl içeren ve pH'sı 6,8 olan 5'er ml'lik Nutrient Broth besi ortamı kullanılmıştır. Kullanılan besi ortamları 121°C 'de 15 dakika sterilize edilmiş ve sterilizasyonun kontrolü için 37°C de 24 saat etüvde bekletilmiştir. İki kez aktiveleştirilen ve 0,5 McFarland ($1,5\times10^8$ hücre/ml) bulanıklık tüpüne göre ayarlanan bakteri kültürlerinden, besi ortamlarına %1'lik ekimler yapılmıştır. pH ve tuz etkisini belirlemek amacıyla kullanılan tüplerin 37°C de 24 ve 48 saatlik inkübasyon sonuçları değerlendirilirken, sıcaklık etkisinin belirleneceği tüplerde 4, 10, 15, 25, 28, 30, 35, 37, 41, 42, 45 ve 50°C de 24 ve 48 saatlik inkübasyon sonunda tüplerde meydana gelen bulanıklık değerlendirilmiştir (Cowan vd 1974).

3.2.7. *Pseudomonas* suşlarının antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesi

İzolatların antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesi amacıyla "disk difüzyon" metodu kullanılmıştır (Collins 1995, Castro-Escarpulli vd 2003). İzolatların antibiyotiklere karşı olan duyarlılıklarının tespiti için kullanılan antibiyotik diskleri ve konsantrasyonları Tablo 3.3'de verilmiştir. NB'de aktiveleştirilen ve yoğunluğu 0,5 Mcfarland bulanıklık tüpüne göre ayarlanan bakteri kültürlerinden 100 μl alınmış ve NA içeren petrilere inoküle edilmiştir. Kültür, drigalski özesi ile besi ortamının yüzeyine homojen bir şekilde yayılmıştır. Antibiyotik diskleri, steril bir pens yardımı ile

besi ortamı yüzeyine yerleştirilmiş ve 37 °C’de 24 saat inkübe edildikten sonra diskler etrafında meydana gelen inhibisyon zonları mm cinsinden ölçülmüştür (Castro-Escarpulli vd 2003). Elde edilen zon çapları National Committee for Clinic Laboratory Standarts’a göre değerlendirilmiştir (NCCLS 1999).

Tablo 3.3 Çalışmada kullanılan antibiyotik diskleri ve konsantrasyonları

Antimikrobik Madde	Sembol	Konsantrasyon
Netilmicin (Oxoid)	NET	30 µg
Cefoclor (Oxoid)	CEC	30 µg
Azithromycin (Oxoid)	AZM	15 µg
Ceftizoxime (Oxoid)	ZOX	30 µg
Cefepime (Oxoid)	FEP	30 µg
Erythromycin (Oxoid)	E	15 µg
Tobramycin (Oxoid)	TOB	10 µg
Cefuroxime (Bioanalyse)	CXM	30 mcg
Cephalothin (Bioanalyse)	KF	30 mcg
Chloramphenicol (Bioanalyse)	C	30 mcg
Cefadroxil (Bioanalyse)	CFR	30 mcg
Novabiocin (Bioanalyse)	NV	5 mcg
Ampicillin (Bioanalyse)	AM	10 mcg
Trimethoprim Sulfamethoxazole (Bioanalyse)	SXT	1,2 µg +23,75 µg
Piperacillin (Bioanalyse)	PRL	100 mcg
Tetracycline (Bioanalyse)	TE	30 mcg
Vancomycin (Bioanalyse)	VA	30 mcg
Cefoperazone (Bioanalyse)	CEP	75 mcg
Cefoxitin (Bioanalyse)	FOX	30 mcg
Cefotaxime (Bioanalyse)	CTX	30 mcg
Gentamycin (Bioanalyse)	CN	10 mcg
Ciprofloxacin (Bioanalyse)	CIP	5 mcg
Clindamycin (Bioanalyse)	DA	2 mcg
Oxacillin (Bioanalyse)	OX	1 mcg
İmipenem (Bioanalyse)	IMP	10 mcg
Amikacin (Bioanalyse)	AK	30 mcg
Teicoplanin (Bioanalyse)	TEC	30 mcg
Amoxicillin+Clavulanic acid (Bioanalyse)	AMC	20 mcg+ 10 mcg
Piperacillin/Tazobactam (10:1) (Bioanalyse)	TZP	110 µg

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

İzole edilen *Pseudomonas* suşları $37\pm0,1^{\circ}\text{C}$ 'de 16-18 saat 10 ml NB besiyerinde geliştirilmiştir. Aktif kültürler 5000 devir/dakika'da 15-20 dakika santrifüjlenmiş ve süpernatant kısım 0,2 μm por çapına sahip disposable filtre ile steril edilmiştir. Çalışmada test mikroorganizmaları olarak *C. albicans*, *B. cereus* RSKK 863, *B. subtilis* ATCC 6633, *S. aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus aureus* ATCC 12598, *E. coli* ATCC 25922, *E. coli* ATCC 35218, *K. pneumonia* ATCC 27736, *M. luteus* NRRL B-4375, *Pr. vulgaris* ATCC 96026, *P. aeruginosa* NRRL B-23 ve *Y. enterocolitica* RSKK 1501 kullanılmıştır.

Test mikroorganizmaları Nutrient Broth besiyerlerinde geliştirilmiş ve aktif kültürlerden steril petrilere 100 μl aktarılmıştır. Her bir petriye daha önceden steril edilen ve sıcaklığı $45-50^{\circ}\text{C}$ 'ye ayarlanmış olan NA besiyerinden 20 ml ilave edilip, test mikroorganizmaları ve besiyerinin homojen bir şekilde karışması sağlanmıştır. Katılaştıran agarlı besiyeri üzerinde 1 cm çapındaki steril çubukla kuyular açılmış ve kuyuların tabanları steril agarla kapatılmıştır. Kuyulara 100'er μl süpernatant ilave edilerek $37\pm0,1^{\circ}\text{C}$ 'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda kuyu çevresindeki zonların çapı mm cinsinden ölçülmüştür (Grinstead ve Barefoot 1992, Reinheimer vd 1990).

3.2.9. İzolatların proteolitik aktivitelerinin belirlenmesi

İzole edilen *Pseudomonas* suşlarının proteolitik aktiviteleri %10 skim milk powder içeren Nutrient Agar besi ortamı kullanılarak "agar spot" ve "agar-kuyu difüzyon" metotları ile belirlenmiştir.

Spot yönteminde; otoklavda 121°C de 15 dakika sterilize edilen besi ortamı önceden steril edilmiş petrilere dökülerek katılaşması sağlandıktan sonra sterilizasyonun kontrolü amacıyla 24 saat 37°C 'de inkübe edilmiştir. 5'er ml steril Nutrient Broth içeren tüplerde $37\pm0,1^{\circ}\text{C}$ 'de 16-18 saat inkübe edilen ve yoğunluğu 0,5 McFarland ($1,5\times 10^8$ hücre/ml) bulanıklık tüpüne göre ayarlanan bakteri kültürlerinden 5'er μl alınarak, besi ortamının yüzeyine belirli aralıklarla nokta (spot) ekimi yapılmıştır. 37°C 'de 24 ve 48

saatlik inkübasyon sonrasında, gelişen bakteri kolonilerinin etrafında meydana gelen hidroliz zonları mm cinsinden ölçülmüştür.

Agar-kuyu difüzyon metodunda ise; izolatlar $37\pm0,1^{\circ}\text{C}$ 'de 16-18 saat 5 ml NB besiyerinde geliştirilmiştir. Aktif kültürler 5000 devir/dakika'da 15-20 dakika santrifüjlenmiş ve süpernatant kısım 0,2 μm por çapına sahip disposable filtre ile steril edilmiştir. %10 skim milk powder içeren Nutrient Agar besi ortamı üzerinde 1 cm çapındaki steril çubukla kuyular açılmış ve kuyuların tabanları steril agarla kapatılmıştır. Kuyulara 100'er μl süpernatant ilave edilerek $37\pm0,1^{\circ}\text{C}$ 'de 24 ve 48 saatlik inkübasyon sonunda kuyuların çevresindeki zonların çapı mm cinsinden ölçülmüştür (Castro-Escarpulli vd 2003).

3.2.10. İzolatların lipolitik aktivitelerinin belirlenmesi

İzolatların lipolitik aktivitelerini belirleyebilmek amacıyla Tribütirin içeren besi ortamı kullanılmıştır. Otoklavda 121°C de 15 dakika sterilize edilen besi ortamı önceden steril edilmiş petrilere dökülerek katılaşması sağlandıktan sonra sterilizasyonun kontrolü ve besi ortamının yüzeyinin kuruması amacıyla 24 saat 37°C 'de inkübe edilmiştir. İki kez aktifleştirilen ve yoğunluğu 0,5 McFarland ($1,5 \times 10^8$ hücre/ml) bulanıklık tüpüne göre ayarlanan bakteri kültürlerinden 5'er μl alınarak, besi ortamının yüzeyine belirli aralıklarla nokta (spot) ekimi yapılmıştır. 37°C de 24 saatlik inkübasyon sonrasında, gelişen bakteri kolonilerinin etrafında meydana gelen hidroliz zonları mm cinsinden ölçülmüştür (Castro-Escarpulli vd 2003).

3.2.11. İzolatların ağır metallere karşı dirençliliklerinin belirlenmesi

İzole edilen *Pseudomonas* suşlarının ağır metallere karşı toleransları “agar-kuyu difüzyon” metodu kullanılarak Nutrient Agar besiyerinde belirlenmiştir (Hussein vd 2004). Çalışmada, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (Merck), $\text{CdN}_2\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (Fluka), $\text{CoN}_2\text{O}_6 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (Fluka), $\text{CrN}_3\text{O}_9 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ (Aldrich), $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ (Merck), $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (Merck), $\text{N}_2\text{NiO}_6 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (Fluka), $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Carlo-Erba) ve $\text{Al}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ (Merck) metal tuzlarının 10, 25, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 400 ve 500 mmol/L'lik konsantrasyonları kullanılmıştır (Hassen vd 1998a). Ayrıca izolatların ikili ve üçlü metal kombinasyonlarına karşı dirençlilik durumları da test edilmiştir (Hussein vd 2004). Kombinasyonlar hazırlanırken konsantrasyonlar tekli metal konsantrasyonları ile aynı alınmıştır.

Hazırlanan metal çözeltileri 110°C’de 15 dakika steril edilmiştir (Hassen vd 1998a, Hassen vd 1998b). İzolatlar 5’er ml’lik steril Nutrient Broth besiyerlerinde iki kez geliştirilmiş ve yoğunluğu 0,5 Mcfarland bulanıklık tüpüne göre ayarlandıktan sonra steril petrilere 100 µl aktarılmıştır. Her bir petriye daha önceden steril edilen ve sıcaklığı 45-50°C’ye ayarlanmış olan NA besiyerinden 20 ml ilave edilip, bakteri ile besiyerinin homojen bir şekilde karışması sağlanmıştır. Katılaştıran agarlı besiyeri üzerinde 1 cm çapındaki steril çubukla kuyular açılmış ve kuyuların tabanları steril agarla kapatılmıştır. Kuyulara, önceden hazırlanıp steril edilmiş metal çözeltilerinden 100’er µl ilave edilerek 37±0,1°C’de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda kuyu çevresindeki inhibisyon zonları çapı mm cinsinden ölçülmüştür (Hassen vd 1998a). Çalışmada kullanılan bütün cam malzemeler deneylerden önce ve sonra asitli sudan (0,1 M HCl) geçirildikten sonra durulanıp distile sudan geçirilmiştir (Hussein vd 2004).

3.2.12. Naftalin toleransı

İzole edilen *Pseudomonas* suşlarının biodegradasyon özelliklerinin araştırılması amacıyla 0,01; 0,02; 0,024; 0,03; 0,04; 0,05; 0,1; 0,2; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 3,5; 4,0; 4,5; 5,0; 5,5; 6,0; 6,25; 6,5; 6,75; 7,0; 7,25; 7,5; 8,0; 9,0; 10 ve 12,5 µg/ml aralığındaki naftalin (Merck) konsantrasyonları kullanılarak, öncelikli olarak MİK değerleri tespit edilmiştir (Filali vd 2000). Çalışmada kullanılan naftalin, metanolde çözülerek 0,2 µm por çapına sahip disposable filtre ile steril edilmiştir.

Steril NB içeren tüp serileri hazırlanarak daha önceden NB’de iki kez aktifleştirip 0,5 MacFarland yoğunluğuna ayarlanan bakteri kültürlerinden hazırlanan tüp serilerine %1’lik ekimler yapılmıştır. Tüp serilerindeki NB, ilave edilecek steril naftalin çözeltisinin hacmi de göz önünde bulundurularak son hacmi 5 ml olacak şekilde hazırlanmıştır. Ekim yapılan tüplere belirlenen konsantrasyon serilerinde naftalin ilave edilmiştir. Tüpler 37°C de 24 ve 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda üremenin görülmediği en düşük naftalin miktarının bulunduğu tüp MİK değeri olarak değerlendirilmiştir (Filali vd 2000).

Pseudomonas suşlarının naftalin varlığında gelişimlerini test etmek amacıyla 250 ml’lik erlenlere 100’er ml NB hazırlanıp sterilize edilmiştir. İki kez aktifleştirilip 0,5 MacFarland yoğunluğuna ayarlanan bakteri kültürlerinden erlenlere %1’lik ekimler

yapılmıştır. Çalışma iki paralelli olarak yapılmıştır. Belirlenen MİK tüpündeki konsantrasyon baz alınarak 100 ml NB içeren erlenlere steril naftalin çözeltisi ilave edilmiştir. Kontrol grubu olarak naftalin içermeyen NB besiyeri kullanılmıştır. Belirli zaman aralıklarında kültür ortamlarından alınan örnekler 1:10 oranında sulandırılarak spektrofotometrede 600 nm’de okunmuştur (Filali vd 2000).

4. BULGULAR

4.1. Bakterilerin İzolasyonu ve Biyokimyasal Testler

MacCONKEY Agar’da uçuk pembe renkte koloni oluşturan ve Cetrimide Agar’da gelişme gösteren izolatların mikroskopik görüntülerinin incelenmesi sonucu Tablo 3.1’de belirtilen bölgelerden alınan embriyonlu kaplumbağa yumurtaları, toprak ve su örneklerinden toplam 23 bakteri izole edilmiştir. Bu bakterilerin pigment üretimleri tespit edilerek, oksidaz, katalaz ve hemoliz testleri yapılmıştır (Tablo 4.1). NA’da pigment üreten *Pseudomonas* suşlarının görüntüsü Şekil 4.1’de verilmiştir.

4.2. Bakterilerin Tiplendirilmesi

API 20NE identifikasyon kiti kullanılarak tiplendirilen izolatların test sonuçları Tablo 4.2’de verilmiştir.

İdentifikasyon test sonuçlarının değerlendirilmesi sonucunda 23 izolattan 6 tanesi *Pseudomonas stutzeri*, 3 tanesi *Pseudomonas putida*, 2 tanesi *Pseudomonas aeruginosa*, 1 tanesi *Pseudomonas fluorescens*, 1 tanesi *Pseudomonas mendocina*, 1 tanesi *Aeromonas hydrophilla/caviae* ve 5 tanesi *Chryseomonas luteola* olarak tespit edilmiştir. 1 izolat tanımlanamazken 2 izolatın test sonuçları tiplendirme için yetersiz bulunmuştur. Çalışmada toplam 13 adet *Pseudomonas* suşu izole edilmiştir. API 20NE identifikasyon kiti ile tiplendirilen suşların adları, izolasyon kaynakları ve doğruluk yüzdeleri Tablo 4.3’de verilmiştir.

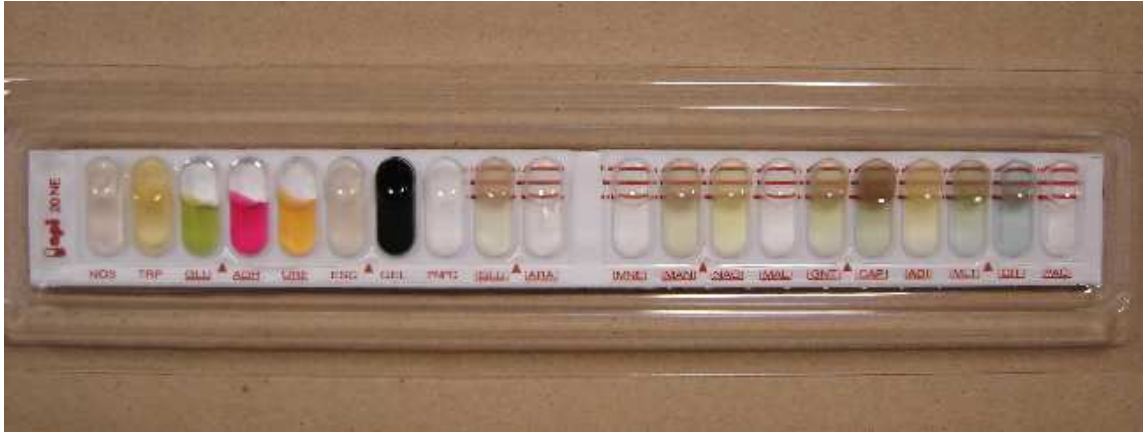
İzolatların %4’lük kısmını tanımlanamayan izolatlar oluştururken, %13’lük kısmını yetersiz tanımlanan izolatlar, %26’lık kısmını *Pseudomonas stutzeri*, %13’lük kısmını *Pseudomonas putida*, %9’lük kısmını *Pseudomonas aeruginosa*, %4’lük kısmını *Pseudomonas fluorescens*, %4’lük kısmını *Pseudomonas mendocina*, %4’lük kısmını *Aeromonas hydrophilla/caviae* ve %22’lik kısmını *Chryseomonas luteola* oluşturmuştur. *P. aeruginosa* P16 suşunun API 20NE kitindeki reaksiyonları Şekil 4.2’de gösterilmiştir.

Tablo 4.1 İzolatların bazı biyokimyasal test sonuçları

Bakteri kodu	Pigment üretimi	Oksidaz	Katalaz	Hemoliz tipi	
				24 saat	48 saat
P1	-	-	-	NH	NH
P4	-	-	-	NH	ZAYIF α
P8	-	-	+	NH	NH
P14	-	+	+	NH	NH
P15	-	-	+	NH	NH
P16	+	+	+++	GÜÇLÜ β	GÜÇLÜ β
P18	-	+	-	NH	NH
P19	-	+	-	NH	NH
P22	-	+	++	NH	NH
P26	-	+	++	NH	NH
P27	-	+	++	β	β
P29	-	-	++	NH	NH
P33	-	-	+++	NH	NH
P34	-	-	+	NH	NH
P37	-	-	++	NH	NH
P39	-	+	++	NH	GÜÇLÜ α
P40	-	+	++	NH	NH
P41	Z*	+	++	NH	NH
P43	-	+	+	NH	NH
P44	-	+	+	NH	NH
P45	Z**	+	+	NH	NH
P46	-	+	+	NH	NH
P52	-	-	+	NH	NH

(Z) : Zayıf üretim, (-) : Negatif reaksiyon, (+) : Pozitif reaksiyon, (++) : Güçlü pozitif reaksiyon, (+++) : Çok güçlü pozitif reaksiyon, NH : non-hemolitik, α : α -hemolitik, β : β -hemolitik. * 25-30°C, ** 25-35°C arasında sarımsı renkte pigment üretimi gözlenmiştir

**Şekil 4.1** *Pseudomonas aeruginosa* P16 suşunun Nutrient Agar’da pigment üretimi



Şekil 4.2 *Pseudomonas aeruginosa* P16 suşunun API 20NE kitindeki reaksiyonları

Tablo 4.2 API 20NE identifikasyon kitiyle yapılan biyokimyasal testlerin sonuçları

Şu no	N O ₃	T R P	<u>G</u> <u>L</u> <u>U</u>	<u>A</u> <u>D</u> <u>H</u>	<u>U</u> <u>R</u> <u>E</u>	E S C	G E L	P N P G	G L U	A R A	M N E	M A N	N A G	M A L	G N T	C A P	A D I	M L T	C I T	P A C	O X
P1	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+	-
P4	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-
P8	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-
P14	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+
P15	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-
P16	+	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+
P18	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+
P19	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+
P22	+	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+
P26	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-	+
P27	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+
P29	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-
P33	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-
P34	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-
P37	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-
P39	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+
P40	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+
P41	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+
P43	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+
P44	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+
P45	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	+
P46	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+
P52	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-

(-) : Negatif reaksiyon, (+) : Pozitif reaksiyon, NO₃ : Potasyum nitrat, TRP : Tryptofan, GLU : Glukozdan asit üretimi, ADH : Arginin, URE : Üre, ESC : Eskülin, GEL : Jelatin, PNPG : p-nitrofenil-β-D-galaktopiranosit, GLU : Glukoz kullanımı, ARA : Arabinoz, MNE : Mannoz, MAN : Mannitol, NAG : N-asetil glukozamin, MAL : Maltoz, GNT : Glukonat, CAP : Kaprat, ADI : Adipat, MLT : Malat, CIT : Sitrat, PAC : Fenil asetat, OX : Oksidaz.

Tablo 4.3 İzolatların adları, izolasyon kaynakları ve doğruluk yüzdeleri

Suş no	Bakteri adı	İzolasyon kaynağı	Kaynak türü	Doğruluk yüzdesi (%)
P1	Tanımlanamadı	Aliğa Petrol Rafinerisi / İzmir	Toprak	
P4	<i>Aeromonas hydrophilla/caviae</i>	Aliğa Petrol Rafinerisi / İzmir	Toprak	99.7
P8	<i>Chryseomonas luteola</i>	Aliğa Petrol Rafinerisi / İzmir	Su	99.7
P14	Yetersiz tanımlama	Karagöl / Denizli	Toprak	
P15	<i>Chryseomonas luteola</i>	Karagöl / Denizli	Toprak	99.7
P16	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Kaplumbağa Yumurtası / Dalaman	Kaplumbağa Yumurtası	99.5
P18	<i>Pseudomonas putida</i>	Kaplumbağa Yumurtası / Dalaman	Kaplumbağa Yumurtası	74.3
P19	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	Aritım Tesisi / Denizli	Su	99.5
P22	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Aritım Tesisi / Denizli	Su	71.1
P26	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Korucuk / Denizli	Su	83.7
P27	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	Güzelköy / Denizli	Su	99.5
P29	Yetersiz tanımlama	Güzelköy / Denizli	Su	
P33	<i>Chryseomonas luteola</i>	Güzelköy / Denizli	Su	99.7
P34	<i>Chryseomonas luteola</i>	Güzelköy / Denizli	Toprak	99.7
P37	<i>Chryseomonas luteola</i>	Sığma / Denizli	Toprak	99.7
P39	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	Korucuk / Denizli	Su	99.5
P40	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	Korucuk / Denizli	Su	99.5
P41	<i>Pseudomonas putida</i>	Zeytinyağı Fabrikası / Aydın	Toprak	94.8
P43	<i>Pseudomonas putida</i>	Zeytinyağı Fabrikası / Aydın	Toprak	99.6
P44	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	Zeytinyağı Fabrikası / Aydın	Toprak	99.7
P45	<i>Pseudomonas mendocina</i>	Zeytinyağı Fabrikası / Aydın	Toprak	99.6
P46	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	Zeytinyağı Fabrikası / Aydın	Toprak	99.7
P52	Yetersiz tanımlama	Zeytinyağı Fabrikası / Aydın	Toprak	

4.3. İzole edilen *Pseudomonas* Suşlarının Gelişim Gösterdikleri Optimum Koşulların Belirlenmesi

İzole edilen *Pseudomonas* suşlarının %0,5; %1,0; %1,5; %2,0; %3,0 ve %4,0 oranında NaCl içeren ve pH değeri 6,8'e ayarlanan Nutrient Broth besiyerindeki gelişimleri Tablo 4.4'de verilmiştir.

Çalışılan tüm konsantrasyonlarda *Pseudomonas* türlerine ait suşların geliştiği gözlenirken, sadece *P. putida* P43 nolu suşun %3,0 ve %4,0 tuz konsantrasyonunda gelişmediği görülmüştür.

Tablo 4.4 *Pseudomonas* suşlarının farklı tuz konsantrasyonlarında gelişimi

<i>Pseudomonas</i> suşları	NaCl konsantrasyonu (%)					
	0,5	1,0	1,5	2,0	3,0	4,0
<i>P. aeruginosa</i> P16	++	++	++	++	++	++
<i>P. aeruginosa</i> P22	+	+	++	++	++	++
<i>P. putida</i> P18	++	++	++	++	++	++
<i>P. putida</i> P41	++	++	++	++	+	Z
<i>P. putida</i> P43	+	+	+	+	-	-
<i>P. stutzeri</i> P19	++	++	++	++	++	++
<i>P. stutzeri</i> P27	+	Z	Z	Z	Z	Z
<i>P. stutzeri</i> P39	++	++	++	++	++	+
<i>P. stutzeri</i> P40	+	+	+	+	+	+
<i>P. stutzeri</i> P44	+	+	+	+	+	Z
<i>P. stutzeri</i> P46	+	+	+	+	+	+
<i>P. fluorescens</i> P26	++	++	+++	+++	++	+
<i>P. mendocina</i> P45	+	++	++	++	+	+

(Z) : Zayıf gelişim, (-) : Bakteri gelişimi yoktur, (+) : Normal gelişme, (++) : Yoğun gelişme, (+++) : Çok yoğun gelişme

İzole edilen *Pseudomonas* suşlarının farklı pH değerlerindeki gelişimleri Tablo 4.5'de verilmiştir. Tabloda da görüldüğü gibi *P. stutzeri* P44 ve P46 nolu suşlar sadece

pH 5,5 ve pH 6,0'da gelişme göstermemiştir. Bu suşlar dışındaki bakteriler tüm pH aralıklarında gelişmiştir

Tablo 4.5 *Pseudomonas* suşlarının farklı pH değerlerinde gelişimi

<i>Pseudomonas</i> suşları	pH değerleri							
	5,5	6,0	6,5	7,0	7,5	8,0	8,5	9,0
<i>P. aeruginosa</i> P16	++	++	++	++	+	+	+	+
<i>P. aeruginosa</i> P22	+	+	+	++	++	+	+	+
<i>P. putida</i> P18	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>P. putida</i> P41	+	++	++	++	++	++	++	++
<i>P. putida</i> P43	Z	+	+	++	+	+	+	+
<i>P. stutzeri</i> P19	Z	+	+	+	+	+	+	+
<i>P. stutzeri</i> P27	++	++	++	++	+	+	+	+
<i>P. stutzeri</i> P39	Z	+	+	+	+	+	+	+
<i>P. stutzeri</i> P40	+	+	++	++	+	+	+	+
<i>P. stutzeri</i> P44	-	-	Z	+	+	+	+	Z
<i>P. stutzeri</i> P46	-	-	+	+	+	+	+	+
<i>P. fluorescens</i> P26	+	+	+	++	++	++	++	++
<i>P. mendocina</i> P45	+	+	+	+	+	+	+	+

(Z) : Zayıf gelişim, (-) : Bakteri gelişimi yoktur, (+) : Normal gelişme, (++) : Yoğun gelişme, (+++) : Çok yoğun gelişme

İzole edilen *Pseudomonas* suşlarının farklı sıcaklık değerlerindeki gelişimleri Tablo 4. 6'da verilmiştir.

İzole edilen *Pseudomonas* suşlarından sadece *P. putida* P41, +4°C'de zayıf bir üreme gösterirken diğer suşların bu sıcaklıkta gelişemediği gözlenmiştir. *P. putida* P43 suşunun ise 10°C'de gelişemediği tespit edilmiştir. 41 ve 42°C'de *P. putida* P41 suşu gelişme göstermemiştir. Denenen sıcaklık aralığında 45 ve 50°C'de suşlar arasında sadece *P. fluorescens* P26 suşu zayıf gelişme gösterirken, diğer tüm suşların gelişimlerinin inhibe olduğu gözlenmiştir.

Tablo 4.6 *Pseudomonas* suşlarının farklı sıcaklık değerlerinde gelişimi

<i>Pseudomonas</i> suşları	Sıcaklık değerleri (°C)											
	+4	10	15	25	28	30	35	37	41	42	45	50
<i>P. aeruginosa</i> P16	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
<i>P. aeruginosa</i> P22	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
<i>P. putida</i> P18	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
<i>P. putida</i> P41	Z	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
<i>P. putida</i> P43	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
<i>P. stutzeri</i> P19	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
<i>P. stutzeri</i> P27	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
<i>P. stutzeri</i> P39	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
<i>P. stutzeri</i> P40	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
<i>P. stutzeri</i> P44	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
<i>P. stutzeri</i> P46	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
<i>P. fluorescens</i> P26	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	Z	Z
<i>P. mendocina</i> P45	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-

(Z) : Zayıf gelişim, (-) : Bakteri gelişimi yoktur, (+) : Gelişme vardır

4.4. İzole Edilen *Pseudomonas* Suşlarının Antibiyotik Duyarlılıklarının Belirlenmesi

İzole edilen *Pseudomonas* suşlarının bu çalışmada kullanılan antibiyotiklere karşı göstermiş oldukları inhibisyon zon çapları Tablo 4.7’de verilmiştir. Elde edilen zon çaplarına göre suşların antibiyotiklere karşı duyarlılık ve dirençlilik durumları Tablo 4.8’de gösterilmiştir.

Tablo 4.7 *Pseudomonas* suşlarının bazı antibiyotiklere karşı gösterdikleri inhibisyon zon çapları (mm)

Antibiyotik	İnhibisyon zon çapı (mm: çap)												
	P16	P22	P18	P41	P43	P19	P27	P39	P40	P44	P46	P26	P45
NET	12	12	12	8	16	12	10	12	10	14	12	16	12
CEC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AZM	8	10	14	-	24	12	10	10	10	16	18	20	-
ZOX	4	4	8	6	14	6	-	4	-	20	16	12	6
FEP	8	10	14	6	16	12	10	10	16	18	18	18	8
E	-	-	-	-	12	-	-	-	-	14	14	12	-
TOB	16	10	12	10	14	8	6	10	10	8	10	8	8
CXM	-	-	-	-	6	-	8	-	10	6	4	8	-
KF	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C	-	-	-	-	14	-	-	-	-	10	20	22	-
CFR	-	-	-	-	-	-	-	-	2	-	-	4	-
NV	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4	-
AM	-	2	2	-	10	4	2	2	2	6	6	4	-
SXT	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8	12	8	-
PRL	12	12	-	12	30	18	20	14	20	16	18	20	12
TE	4	12	14	10	14	12	12	14	12	20	18	20	10
VA	-	-	-	-	6	-	-	-	-	-	-	-	-
CEP	8	-	14	8	14	12	16	14	12	16	14	14	10
FOX	-	8	6	-	-	8	12	6	12	12	10	14	-
CTX	10	6	6	4	14	16	10	12	14	14	14	14	6
CN	8	6	10	6	12	6	6	12	8	10	10	8	8
CIP	24	18	20	14	30	26	-	12	22	16	22	30	16
DA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
OX	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
IMP	18	20	22	26	30	22	22	22	22	22	26	40	22
AK	16	10	12	12	16	16	12	14	12	14	16	16	14
TEC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AMC	-	6	4	2	16	-	8	6	10	8	8	8	-
TZP	12	18	16	10	24	20	16	22	24	20	16	22	12

(-) : Antibiyotik disk etrafında inhibisyon zonu yoktur, NET : Netilmicin (30µg), CEC : Cefoclor (30µg), AZM : Azithromycin (15µg), ZOX : Ceftizoxime (30µg), FEP : Cefepime (30µg), E : Erythromycin (15 µg), TOB : Tobramycin (10 µg), CXM : Cefuroxime (30mcg), KF : Cephalothin (30mcg), C : Chloramphenicol (30mcg), CFR : Cefadroxil (30mcg), NV : Novobiocin (5mcg), AM : Ampicillin (10 mcg), SXT : Trimethoprim Sulfamethoxazole (1.2 µg + 23.75 µg), PRL : Piperacillin (100 mcg), TE : Tetracycline (30mcg), VA : Vancomycin (30mcg), CEP : Cefoperozone (75 mcg), FOX : Cefoxitin (30mcg), CTX : Cefotaxime (30mcg), CN : Gentamycin (10 mcg), CIP : Ciprofloxacin (5 mcg), DA : Clindamycin (2 mcg), OX : Oxacillin (1 mcg), IMP : İmipenem (10 mcg), AK : Amikacin (30 mcg), TEC : Teicoplanin (30 mcg), AMC : Amoxicillin+Clavulanic acid (20 mcg+ 10 mcg), TZP : Piperacillin/Tazobactam (10:1) (110 µg)

Tablo 4.8 Suşların inhibisyon zon çaplarına göre antibiyotiklere olan dirençlilik ve duyarlılıkları

Antibiyotik	P16	P22	P18	P41	P43	P19	P27	P39	P40	P44	P46	P26	P45
NET	R	R	R	R	D	R	R	R	R	OD	R	D	R
CEC	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
AZM	R	R	OD	R	D	R	R	R	R	OD	D	D	R
ZOX	R	R	R	R	R	R	R	R	R	D	OD	R	R
FEP	R	R	R	R	OD	R	R	R	OD	D	D	D	R
E	R	R	R	R	R	R	R	R	R	OD	OD	R	R
TOB	D	R	R	R	OD	R	R	R	R	R	R	R	R
CXM	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
KF	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
C	R	R	R	R	OD	R	R	R	R	R	D	D	R
CFR	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
NV	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
AM	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
SXT	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	OD	R	R
PRL	R	R	R	R	D	D	D	R	D	R	D	D	R
TE	R	R	R	R	R	R	R	R	R	D	OD	D	R
VA	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
CEP	R	R	R	R	R	R	OD	R	R	OD	R	R	R
FOX	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
CTX	R	R	R	R	R	OD	R	R	R	R	R	R	R
CN	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
CIP	D	OD	OD	R	D	D	R	R	D	OD	D	D	OD
DA	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
OX	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
IMP	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D
AK	OD	R	R	R	OD	OD	R	R	R	R	OD	OD	R
TEC	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
AMC	R	R	R	R	OD	R	R	R	R	R	R	R	R
TZP	R	R	R	R	D	D	R	D	D	D	R	D	R

(R) : Dirençli, (OD) : Orta derecede duyarlı, (D) : Duyarlı, NET : Netilmicin (30µg), CEC : Cefoclor (30µg), AZM : Azithromycin (15µg), ZOX : Ceftizoxime (30µg), FEP : Cefepime (30µg), E : Erythromycin (15 µg), TOB : Tobramycin (10 µg), CXM : Cefuroxime (30mcg), KF : Cephalothin (30mcg), C : Chloramphenicol (30mcg), CFR : Cefadroxil (30mcg), NV : Novobiocin (5mcg), AM : Ampicillin (10 mcg), SXT : Trimethoprim Sulfamethoxazole (1.2 µg + 23.75 µg), PRL : Piperacillin (100 mcg), TE : Tetracycline (30mcg), VA : Vancomycin (30mcg), CEP : Cefoperazone (75 mcg), FOX : Cefoxitin (30mcg), CTX : Cefotaxime (30mcg), CN : Gentamycin (10 mcg), CIP : Ciprofloxacin (5 mcg), DA : Clindamycin (2 mcg), OX : Oxacillin (1 mcg), IMP : İmipenem (10 mcg), AK : Amikacin (30 mcg), TEC : Teicoplanin (30 mcg), AMC : Amoxicillin+Clavulanic acid (20 mcg+ 10 mcg), TZP : Piperacillin/Tazobactam (10:1) (110 µg)

4.5. *Pseudomonas* Suşlarının Bazı Patojen ve Kontaminant Mikroorganizmalar Üzerine İnhibisyon Etkisi

Pseudomonas suşlarının *C. albicans*, *B. cereus* RSKK 863, *B. subtilis* ATCC 6633, *S. aureus* ATCC 25923, *S. aureus* ATCC 12598, *E. coli* ATCC 25922, *E. coli* ATCC 35218, *K. pneumonia* ATCC 27736, *M. luteus* NRRL B-4375, *Pr. vulgaris* ATCC 96026, *P. aeruginosa* NRRL B-23, ve *Y. enterocolitica* RSKK 1501 üzerine genel inhibisyon etkisi Tablo 4.9’da verilmiştir. Çalışmada kullanılan *Pseudomonas* bakterilerinden sadece *P. aeruginosa* P16’nın *S. aureus* ATCC 25923 suşu üzerine inhibisyon etkisi görülürken diğer test organizmaları üzerine antimikrobiyal aktivite göstermediği tespit edilmiştir. *P. aeruginosa* P16’nın *S. aureus* bakterisi üzerine olan inhibisyon etkisi Şekil 4.3’te verilmiştir. *P. aeruginosa* P22, *P. putida* P18, *P. putida* P41, *P. putida* P43, *P. stutzeri* P19, *P. stutzeri* P27, *P. stutzeri* P39, *P. stutzeri* P40, *P. stutzeri* P44, *P. stutzeri* P46, *P. fluorescens* P26, ve *P. mendocina* P45 suşlarının test bakterileri üzerine inhibisyon etkisi gözlenmemiştir.

Tablo 4.9 *Pseudomonas* suşlarının bazı patojen ve kontaminant bakteriler üzerindeki antimikrobiyal aktivitesini gösteren inhibisyon zonlarının çapları (mm)

<i>Pseudomonas</i> suşları	Test organizmaları											
	<i>C. albicans</i>	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>S. aureus</i> ATCC 12598	<i>Y. enterocolitica</i> RSKK 1501	<i>M. luteus</i> NRRLB- 4375	<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	<i>B. cereus</i> RSKK 863	<i>E. coli</i> ATCC 35218	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>K. pneumonia</i> ATCC 27736	<i>P. aeruginosa</i> NRRL B-23	<i>Pr. vulgaris</i> ATCC 96026
<i>P. aeruginosa</i> P16	-	16±0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>P. aeruginosa</i> P22	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>P. putida</i> P18	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>P. putida</i> P41	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>P. putida</i> P43	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>P. stutzeri</i> P19	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>P. stutzeri</i> P27	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>P. stutzeri</i> P39	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>P. stutzeri</i> P40	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>P. stutzeri</i> P44	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>P. stutzeri</i> P46	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>P. fluorescens</i> P26	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>P. mendocina</i> P45	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

(-)

:

İnhibisyon

yoktur.

4.6. İzole Edilen *Pseudomonas* Suşlarının Proteolitik Aktivitelerinin Belirlenmesi

Çalışmada kullanılan *Pseudomonas* suşlarının agar spot ve agar-kuyu difüzyon yöntemi ile belirlenen proteolitik aktivite sonuçları Tablo 4.10’da verilmiştir.

Tablo 4.10 *Pseudomonas* suşlarının proteolitik aktivite zon çapları (mm)

Suş adları	Hidroliz zonu (mm: çap)		Hidroliz zonu (mm: çap)	
	Agar-kuyu difüzyon		Agar spot	
	24 saat	48 saat	24 saat	48 saat
<i>P. aeruginosa</i> P16	4±0	5±1	8±0	14±0
<i>P. aeruginosa</i> P22	-	-	2±0	2±0
<i>P. putida</i> P18	-	-	-	-
<i>P. putida</i> P41	-	-	-	-
<i>P. putida</i> P43	-	-	-	-
<i>P. stutzeri</i> P19	-	-	2±0	5±1
<i>P. stutzeri</i> P27	-	-	2±0	2.5±0.5
<i>P. stutzeri</i> P39	-	-	-	-
<i>P. stutzeri</i> P40	-	-	-	-
<i>P. stutzeri</i> P44	-	-	-	-
<i>P. stutzeri</i> P46	-	-	-	-
<i>P. fluorescens</i> P26	-	-	-	-
<i>P. mendocina</i> P45	-	-	-	-

(-) : Hidroliz zonu yok

P. aeruginosa P16 suşunun, skim milk powder içeren besi ortamında, spot ve agar-kuyu yöntemi ile belirlenen proteolitik aktivitesi Şekil 4.4’de gösterilmiştir.

4.7. İzole Edilen *Pseudomonas* Suşlarının Lipolitik Aktivitelerinin Belirlenmesi

Pseudomonas suşlarının tribütirin içeren besi ortamında agar difüzyon yöntemi ile belirlenen lipolitik aktiviteleri Tablo 4.11’de verilmiştir.

Tablo 4.11 *Pseudomonas* suşlarının lipolitik aktiviteleri

Suş adları	Lipolitik aktivite
<i>P. aeruginosa</i> P16	+
<i>P. aeruginosa</i> P22	+
<i>P. putida</i> P18	+
<i>P. putida</i> P41	+
<i>P. putida</i> P43	+
<i>P. stutzeri</i> P19	+
<i>P. stutzeri</i> P27	+
<i>P. stutzeri</i> P39	+
<i>P. stutzeri</i> P40	+
<i>P. stutzeri</i> P44	+
<i>P. stutzeri</i> P46	+
<i>P. fluorescens</i> P26	+
<i>P. mendocina</i> P45	+

(+) Lipolitik aktivite vardır.

**Şekil 4.3** *P. aeruginosa* P16'nın *S. aureus* ATCC 25923 üzerine inhibisyon zonu**Şekil 4.4** *P. aeruginosa* P16'nın spot ve agar kuyu yöntemi ile belirlenen proteolitik aktivite

4.8. İzolatların Ağır Metallere Karşı Dirençliliklerinin Belirlenmesi

Çalışmada kullanılan metal tuzlarının tekli (MnSO_4 , CdN_2O_6 , CoN_2O_6 , CrN_3O_9 , $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$, CuSO_4 , N_2NiO_6 , ZnSO_4 ve $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$), ikili (MnZn , MnCu , CuZn , CdCr , CdCo ve CoCr) ve üçlü (MnZnCu ve CdCrCo) kombinasyonlarının *Pseudomonas* suşları üzerine etkileri agar kuyu difüzyon yöntemi ile belirlenmiş ve sonuçlar mm cinsinden ölçülmüştür.

Bu çalışmada elde edilen tekli metal sonuçları Tablo 4.12, 4.13, 4.14, 4.15, 4.16, 4.17, 4.18, 4.19 ve 4.20’de verilmiştir.

Tablo 4.12 *Pseudomonas* suşlarının farklı MnSO_4 konsantrasyonlarına karşı göstermiş oldukları inhibisyon zon çapları (mm : çap)

Suş adı	MnSO_4 (mmol/L)									
	10	25	50	100	150	200	250	300	400	500
<i>P. aeruginosa</i> P16	0±0	0±0	0±0	4±0	6±0	8±0	8±0	8±0	9±1	10±0
<i>P. aeruginosa</i> P22	0±0	0±0	6±0	12±0	16±0	19±1	20±0	20±0	22±0	22±0
<i>P. putida</i> P18	0±0	6±0	10±0	14±0	14±0	18±0	20±0	20±0	22±0	22±0
<i>P. putida</i> P41	0±0	4±0	6±0	10±0	16±0	12±0	14±0	15±1	16±0	16±0
<i>P. putida</i> P43	0±0	4±0	8±0	12±0	15±1	16±0	18±0	18±0	19±1	19±1
<i>P. stutzeri</i> P19	0±0	0±0	4±0	11±1	16±0	16±0	18±0	20±0	20±0	20±0
<i>P. stutzeri</i> P27	0±0	6±0	8±0	13±1	16±0	18±0	20±0	20±0	22±0	22±0
<i>P. stutzeri</i> P39	0±0	6±0	12±0	15±1	16±0	18±0	19±1	20±0	22±0	22±0
<i>P. stutzeri</i> P40	0±0	4±0	8±0	13±1	12±0	17±1	18±0	19±1	20±0	20±0
<i>P. stutzeri</i> P44	0±0	4±0	7±1	12±0	14±0	15±1	17±1	18±0	20±0	20±0
<i>P. stutzeri</i> P46	0±0	0±0	5±1	12±0	14±0	16±0	17±1	18±0	20±0	20±0
<i>P. fluorescens</i> P26	0±0	2±0	6±0	12±0	12±0	16±0	17±1	18±0	20±0	20±0
<i>P. mendocina</i> P45	0±0	4±0	6±0	10±0	15±1	14±0	15±1	16±0	17±1	17±1

Tablo 4.13 *Pseudomonas* suşlarının farklı $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$ konsantrasyonlarına karşı göstermiş oldukları inhibisyon zon çapları (mm : çap)

Suş adı	$\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$ (mmol/L)									
	10	25	50	100	150	200	250	300	400	500
<i>P. aeruginosa</i> P16	4±0	8±0	10±0	16±0	20±0	21±1	22±0	24±0	23±1	23±1
<i>P. aeruginosa</i> P22	10±0	13±1	15±1	17±1	17±1	17±1	20±0	20±0	22±0	22±0
<i>P. putida</i> P18	6±0	10±0	12±0	14±0	18±0	21±1	22±0	22±0	22±0	22±0
<i>P. putida</i> P41	13±1	14±0	15±1	16±0	16±0	18±0	19±1	19±1	20±0	20±0
<i>P. putida</i> P43	12±0	16±0	19±1	21±1	21±1	22±0	23±1	23±1	24±0	24±0
<i>P. stutzeri</i> P19	10±0	14±0	16±0	19±1	20±0	22±0	23±1	23±1	24±0	25±1
<i>P. stutzeri</i> P27	10±0	14±0	16±0	19±1	20±0	20±0	21±1	22±0	23±1	23±1
<i>P. stutzeri</i> P39	8±0	10±0	14±0	15±1	18±0	18±0	19±1	20±0	20±0	21±1
<i>P. stutzeri</i> P40	8±0	10±0	14±0	15±1	17±1	19±1	20±0	20±0	20±0	20±0
<i>P. stutzeri</i> P44	17±1	18±0	22±0	23±1	23±1	24±0	24±0	24±0	23±1	24±0
<i>P. stutzeri</i> P46	20±0	20±0	22±0	21±1	22±0	21±1	22±0	22±0	24±0	24±0
<i>P. fluorescens</i> P26	10±0	15±1	16±0	20±0	20±0	22±0	23±1	24±0	24±0	24±0
<i>P. mendocina</i> P45	13±1	16±0	19±1	22±0	23±1	23±1	22±0	22±0	22±0	22±0

Tablo 4.14 *Pseudomonas* suşlarının farklı $Pb(NO_3)_2$ konsantrasyonlarına karşı göstermiş oldukları inhibisyon zon çapları (mm : çap)

Suş adı	$Pb(NO_3)_2$ (mmol/L)									
	10	25	50	100	150	200	250	300	400	500
<i>P. aeruginosa</i> P16	4±0	7±1	12±0	17±1	20±0	21±1	24±0	27±1	25±1	26±0
<i>P. aeruginosa</i> P22	0±0	4±0	6±0	16±0	19±1	20±0	22±0	22±0	24±0	25±1
<i>P. putida</i> P18	2±0	5±1	7±1	16±0	16±0	20±0	20±0	22±0	22±0	22±0
<i>P. putida</i> P41	2±0	4±0	8±	15±1	18±0	20±0	21±1	23±1	24±0	24±0
<i>P. putida</i> P43	2±0	6±0	8±0	16±0	18±0	22±0	24±0	24±0	24±0	24±0
<i>P. stutzeri</i> P19	2±0	4±0	6±0	16±0	19±1	20±0	22±0	23±1	24±0	24±0
<i>P. stutzeri</i> P27	2±0	5±1	8±0	15±1	20±0	22±0	23±1	23±1	24±0	24±0
<i>P. stutzeri</i> P39	2±0	4±0	4±0	16±0	20±0	22±0	22±0	23±1	23±1	24±0
<i>P. stutzeri</i> P40	2±0	4±0	8±0	16±0	20±0	21±1	22±0	22±0	23±1	24±0
<i>P. stutzeri</i> P44	2±0	6±0	12±0	16±0	22±0	24±0	24±0	26±0	28±0	28±0
<i>P. stutzeri</i> P46	2±0	6±0	12±0	20±0	22±0	24±0	24±0	24±0	26±0	26±0
<i>P. fluorescens</i> P26	2±0	5±1	8±0	15±1	20±0	21±1	22±0	24±0	25±1	25±1
<i>P. mendocina</i> P45	2±0	6±0	8±0	14±0	18±0	20±0	22±0	24±0	24±0	24±0

Tablo 4.15 *Pseudomonas* suşlarının farklı $CuSO_4$ konsantrasyonlarına karşı göstermiş oldukları inhibisyon zon çapları (mm : çap)

Suş adı	$CuSO_4$ (mmol/L)									
	10	25	50	100	150	200	250	300	400	500
<i>P. aeruginosa</i> P16	4±0	7±1	9±1	11±1	16±0	17±1	18±0	20±0	19±1	20±0
<i>P. aeruginosa</i> P22	2±0	6±0	8±0	10±0	12±0	14±0	17±1	18±0	20±0	20±0
<i>P. putida</i> P18	4±0	8±0	10±0	14±0	17±1	18±0	18±0	20±0	21±1	22±0
<i>P. putida</i> P41	0±0	6±0	10±0	12±0	14±0	16±0	16±0	17±1	19±1	20±0
<i>P. putida</i> P43	4±0	6±0	10±0	18±0	20±0	22±0	24±0	24±0	26±0	26±0
<i>P. stutzeri</i> P19	4±0	6±0	10±0	14±0	15±1	16±0	18±0	19±1	21±1	22±0
<i>P. stutzeri</i> P27	6±0	8±0	10±0	14±0	16±0	18±0	18±0	18±0	19±1	19±1
<i>P. stutzeri</i> P39	6±0	8±0	10±0	14±0	16±0	17±1	17±1	18±0	18±0	20±0
<i>P. stutzeri</i> P40	4±0	8±0	10±0	14±0	16±0	17±1	18±0	18±0	20±0	20±0
<i>P. stutzeri</i> P44	4±0	8±0	14±0	16±0	18±0	20±0	21±1	22±0	24±0	24±0
<i>P. stutzeri</i> P46	4±0	8±0	12±0	16±0	18±0	20±0	22±0	22±0	22±0	23±1
<i>P. fluorescens</i> P26	4±0	8±0	12±0	16±	18±0	19±1	22±0	22±0	24±0	26±0
<i>P. mendocina</i> P45	3±1	6±0	8±0	13±1	14±0	16±0	16±0	18±0	20±0	20±0

Tablo 4.16 *Pseudomonas* suşlarının farklı N_2NiO_6 konsantrasyonlarına karşı göstermiş oldukları inhibisyon zon çapları (mm : çap)

Suş adı	N_2NiO_6 (mmol/L)									
	10	25	50	100	150	200	250	300	400	500
<i>P. aeruginosa</i> P16	5±1	8±0	13±1	17±1	20±0	20±0	21±1	22±0	22±0	23±1
<i>P. aeruginosa</i> P22	0±0	8±0	12±0	16±0	16±0	18±0	20±0	20±0	20±0	20±0
<i>P. putida</i> P18	6±0	10±0	12±0	12±0	14±0	16±0	16±0	18±0	18±0	18±0
<i>P. putida</i> P41	4±0	7±1	10±0	12±0	14±0	16±0	18±0	18±0	18±0	18±0
<i>P. putida</i> P43	6±0	10±0	14±0	18±0	22±0	22±0	22±0	24±0	24±0	24±0
<i>P. stutzeri</i> P19	0±0	8±0	10±0	14±0	16±0	18±0	20±0	20±0	22±0	22±0
<i>P. stutzeri</i> P27	0±0	7±1	10±0	14±0	16±0	18±0	19±1	21±1	22±0	22±0
<i>P. stutzeri</i> P39	0±0	6±0	10±0	14±0	16±0	16±0	18±0	18±0	20±0	20±0
<i>P. stutzeri</i> P40	0±0	6±0	10±0	14±0	16±0	18±0	18±0	18±0	20±0	20±0
<i>P. stutzeri</i> P44	4±0	7±1	12±0	16±0	17±1	18±0	21±1	22±0	22±0	22±0
<i>P. stutzeri</i> P46	0±0	8±0	10±0	14±0	17±1	20±0	20±0	22±0	22±0	22±0
<i>P. fluorescens</i> P26	6±0	8±0	12±0	16±0	18±0	20±0	20±0	20±0	21±1	21±1
<i>P. mendocina</i> P45	2±0	8±0	12±0	14±0	16±0	18±0	18±0	18±0	20±0	20±0

Tablo 4.17 *Pseudomonas* suşlarının farklı $ZnSO_4$ konsantrasyonlarına karşı göstermiş oldukları inhibisyon zon çapları (mm : çap)

Suş adı	$ZnSO_4$ (mmol/L)									
	10	25	50	100	150	200	250	300	400	500
<i>P. aeruginosa</i> P16	0±0	4±0	6±0	8±0	10±0	10±0	12±0	12±0	12±0	13±1
<i>P. aeruginosa</i> P22	10±0	12±0	15±1	19±1	19±1	20±0	21±1	20±0	21±1	20±0
<i>P. putida</i> P18	8±0	12±0	16±0	18±0	18±0	20±0	20±0	20±0	20±0	20±0
<i>P. putida</i> P41	8±0	14±0	16±0	17±1	18±0	18±0	18±0	18±0	17±1	17±1
<i>P. putida</i> P43	12±0	16±0	19±1	20±0	20±0	20±0	22±0	22±0	22±0	22±0
<i>P. stutzeri</i> P19	6±0	9±1	15±1	19±1	19±1	20±0	20±0	20±0	20±0	21±1
<i>P. stutzeri</i> P27	8±0	10±0	14±0	16±0	16±0	18±0	18±0	18±0	17±1	18±0
<i>P. stutzeri</i> P39	10±0	14±0	17±1	20±0	20±0	19±1	19±1	20±0	19±1	20±0
<i>P. stutzeri</i> P40	8±0	10±0	14±0	16±0	16±0	18±0	18±0	18±0	18±0	18±0
<i>P. stutzeri</i> P44	12±0	18±0	20±0	22±0	22±0	24±0	23±1	24±0	24±0	24±0
<i>P. stutzeri</i> P46	12±0	16±0	20±0	20±0	20±0	20±0	20±0	20±0	20±0	20±0
<i>P. fluorescens</i> P26	7±1	12±0	16±0	18±0	20±0	20±0	19±1	19±1	19±1	20±0
<i>P. mendocina</i> P45	6±0	10±0	14±0	18±0	20±0	20±0	22±0	22±0	24±0	24±0

Tablo 4.18 *Pseudomonas* suşlarının farklı $Al(NO_3)_3$ konsantrasyonlarına karşı göstermiş oldukları inhibisyon zon çapları (mm : çap)

Suş adı	$Al(NO_3)_3$ (mmol/L)									
	10	25	50	100	150	200	250	300	400	500
<i>P. aeruginosa</i> P16	0±0	0±0	2±0	8±0	13±1	15±1	16±0	17±1	18±0	19±1
<i>P. aeruginosa</i> P22	2±0	6±0	8±0	11±1	13±1	14±0	16±0	16±0	18±0	18±0
<i>P. putida</i> P18	2±0	6±0	9±1	12±0	14±0	16±0	18±0	20±0	22±0	22±0
<i>P. putida</i> P41	2±0	5±1	7±1	10±0	12±0	14±0	15±1	16±0	18±0	19±1
<i>P. putida</i> P43	4±0	10±0	12±0	16±0	18±0	20±0	22±0	22±0	24±0	24±0
<i>P. stutzeri</i> P19	0±0	5±1	8±0	11±1	13±1	16±0	18±0	18±0	20±0	20±0
<i>P. stutzeri</i> P27	2±0	6±0	8±0	12±0	14±0	16±0	18±0	18±0	19±1	19±1
<i>P. stutzeri</i> P39	6±0	8±0	10±0	16±0	18±0	20±0	20±0	21±1	22±0	24±0
<i>P. stutzeri</i> P40	2±0	6±0	8±0	11±1	12±0	14±0	16±0	17±1	18±0	19±1
<i>P. stutzeri</i> P44	6±0	7±1	9±1	12±0	14±0	16±0	18±0	19±1	20±0	22±0
<i>P. stutzeri</i> P46	6±0	6±0	8±0	12±0	14±0	16±0	18±0	18±0	20±0	20±0
<i>P. fluorescens</i> P26	2±0	6±0	8±0	12±0	14±0	16±0	17±1	18±0	19±1	20±0
<i>P. mendocina</i> P45	4±0	6±0	8±0	12±0	14±0	16±0	16±0	16±0	18±0	19±1

Tablo 4.19 *Pseudomonas* suşlarının farklı CrN_3O_9 konsantrasyonlarına karşı göstermiş oldukları inhibisyon zon çapları (mm : çap)

Suş adı	CrN_3O_9 (mmol/L)									
	10	25	50	100	150	200	250	300	400	500
<i>P. aeruginosa</i> P16	6±0	8±0	10±0	15±1	16±0	18±0	20±0	22±0	24±0	24±0
<i>P. aeruginosa</i> P22	6±0	10±0	12±0	15±1	17±1	20±0	21±1	21±1	22±0	22±0
<i>P. putida</i> P18	7±1	11±1	12±0	17±1	17±1	22±0	22±0	24±0	24±0	26±0
<i>P. putida</i> P41	6±0	10±0	12±0	16±0	18±0	20±0	20±0	22±0	23±1	24±0
<i>P. putida</i> P43	8±0	14±0	16±0	20±0	22±0	26±0	28±0	27±1	30±0	30±0
<i>P. stutzeri</i> P19	6±0	10±0	14±0	18±0	19±1	20±0	20±0	21±1	23±1	25±1
<i>P. stutzeri</i> P27	7±1	10±0	13±1	16±0	17±1	19±1	20±0	20±0	22±0	22±0
<i>P. stutzeri</i> P39	8±0	10±0	14±0	18±0	20±0	22±0	22±0	24±0	24±0	25±1
<i>P. stutzeri</i> P40	8±0	10±0	14±0	16±0	20±0	21±1	21±1	23±1	24±0	25±1
<i>P. stutzeri</i> P44	8±0	10±0	14±0	18±0	22±0	24±0	26±0	26±0	28±0	30±0
<i>P. stutzeri</i> P46	8±0	11±1	14±0	20±0	22±0	24±0	24±0	26±0	28±0	30±0
<i>P. fluorescens</i> P26	6±0	8±0	12±0	17±1	20±0	20±0	22±0	23±1	24±0	26±0
<i>P. mendocina</i> P45	7±1	10±0	12±0	16±0	18±0	20±0	20±0	20±0	22±0	23±1

Tablo 4.20 *Pseudomonas* suşlarının farklı CoN_2O_6 konsantrasyonlarına karşı göstermiş oldukları inhibisyon zon çapları (mm : çap)

Suş adı	CoN_2O_6 (mmol/L)									
	10	25	50	100	150	200	250	300	400	500
<i>P. aeruginosa</i> P16	11±1	17±1	18±0	21±1	21±1	24±0	25±1	24±0	26±0	27±1
<i>P. aeruginosa</i> P22	17±1	18±0	21±1	22±0	24±0	24±0	27±1	28±0	27±1	28±0
<i>P. putida</i> P18	18±0	18±0	20±0	20±0	23±1	24±0	25±1	25±1	24±0	25±1
<i>P. putida</i> P41	10±0	14±0	14±0	18±0	20±0	22±0	22±0	22±0	22±0	22±0
<i>P. putida</i> P43	20±0	28±0	28±0	29±1	29±1	30±0	29±1	29±1	30±0	29±1
<i>P. stutzeri</i> P19	15±1	22±0	26±0	29±1	31±1	32±0	32±0	33±1	33±1	34±0
<i>P. stutzeri</i> P27	18±0	20±0	22±0	22±0	25±1	26±0	26±0	26±0	26±0	27±1
<i>P. stutzeri</i> P39	16±0	21±1	23±1	26±0	27±1	26±0	28±0	29±1	28±0	29±1
<i>P. stutzeri</i> P40	14±0	18±0	20±0	22±0	22±0	22±0	23±1	26±0	30±0	30±0
<i>P. stutzeri</i> P44	12±0	20±0	23±1	27±1	28±0	29±1	30±0	30±0	29±1	29±1
<i>P. stutzeri</i> P46	20±0	24±0	26±0	27±1	29±1	30±0	31±1	30±0	30±0	31±1
<i>P. fluorescens</i> P26	17±1	22±0	26±0	28±0	30±0	31±1	32±0	32±0	31±1	32±0
<i>P. mendocina</i> P45	10±0	16±0	20±0	20±0	22±0	23±1	25±1	25±1	26±0	26±0

Mn, Zn, Cu ve Cr, Cd, Co metallerinin ikili ve üçlü kombinasyonlarının kullanımı sonucu elde edilen zon çapları Tablo 4.21, 4.22, 4.23, 4.24, 4.25, 4.26, 4.27 ve 4.28’de verilmiştir.

Tablo 4.21 *Pseudomonas* suşlarının farklı MnZn konsantrasyonlarına karşı göstermiş oldukları inhibisyon zon çapları (mm : çap)

Suş adı	MnZn (mmol/L)									
	10	25	50	100	150	200	250	300	400	500
<i>P. aeruginosa</i> P16	2±0	4±0	6±0	8±0	10±0	12±0	14±0	14±0	14±0	14±0
<i>P. fluorescens</i> P26	9±1	14±0	16±0	17±1	18±0	20±0	22±0	22±0	22±0	22±0
<i>P. stutzeri</i> P40	10±0	16±0	18±0	20±0	20±0	20±0	20±0	21±1	22±0	22±0
<i>P. putida</i> P41	10±0	14±0	15±1	16±0	18±0	18±0	19±1	20±0	21±1	22±0
<i>P. mendocina</i> P45	6±0	10±0	14±0	18±0	20±0	20±0	20±0	20±0	22±0	22±0

Tablo 4.22 *Pseudomonas* suşlarının farklı MnCu konsantrasyonlarına karşı göstermiş oldukları inhibisyon zon çapları (mm : çap)

Suş adı	MnCu (mmol/L)									
	10	25	50	100	150	200	250	300	400	500
<i>P. aeruginosa</i> P16	2±0	4±0	6±0	10±0	14±0	16±0	18±0	18±0	18±0	18±0
<i>P. fluorescens</i> P26	2±0	8±0	12±0	16±0	16±0	17±1	18±0	18±0	20±0	20±0
<i>P. stutzeri</i> P40	6±0	10±0	16±0	18±0	20±0	20±0	20±0	22±0	22±0	22±0
<i>P. putida</i> P41	4±0	6±0	8±0	10±0	12±0	14±0	16±0	18±0	20±0	22±0
<i>P. mendocina</i> P45	4±0	4±0	10±0	12±0	14±0	16±0	16±0	18±0	20±0	22±0

Tablo 4.23 *Pseudomonas* suşlarının farklı CuZn konsantrasyonlarına karşı göstermiş oldukları inhibisyon zon çapları (mm : çap)

Suş adı	CuZn (mmol/L)									
	10	25	50	100	150	200	250	300	400	500
<i>P. aeruginosa</i> P16	4±0	6±0	9±1	13±1	16±0	16±0	16±0	18±0	20±0	20±0
<i>P. fluorescens</i> P26	12±0	16±0	16±0	18±0	20±0	21±1	22±0	23±1	24±0	24±0
<i>P. stutzeri</i> P40	12±0	16±0	17±1	20±0	20±0	20±0	21±1	22±0	23±1	24±0
<i>P. putida</i> P41	14±0	16±0	16±0	18±0	18±0	18±0	19±1	20±0	22±0	22±0
<i>P. mendocina</i> P45	10±0	14±0	16±0	16±0	17±1	18±0	18±0	18±0	20±0	20±0

Tablo 4.24 *Pseudomonas* suşlarının farklı MnZnCu konsantrasyonlarına karşı göstermiş oldukları inhibisyon zon çapları (mm : çap)

Suş adı	MnZnCu (mmol/L)									
	10	25	50	100	150	200	250	300	400	500
<i>P. aeruginosa</i> P16	2±0	6±0	8±0	14±0	14±0	16±0	16±0	16±0	18±0	18±0
<i>P. fluorescens</i> P26	11±1	14±0	16±0	18±0	19±1	21±1	22±0	22±0	23±1	23±1
<i>P. stutzeri</i> P40	12±0	16±0	17±1	18±0	20±0	20±0	20±0	21±1	22±0	22±0
<i>P. putida</i> P41	14±0	17±1	18±0	18±0	18±0	20±0	20±0	22±0	22±0	22±0
<i>P. mendocina</i> P45	8±0	12±0	16±0	17±1	19±1	20±0	21±1	21±1	22±0	22±0

Tablo 4.25 *Pseudomonas* suşlarının farklı CdCr konsantrasyonlarına karşı göstermiş oldukları inhibisyon zon çapları (mm : çap)

Suş adı	CdCr (mmol/L)									
	10	25	50	100	150	200	250	300	400	500
<i>P. aeruginosa</i> P16	6±0	8±0	10±0	14±0	16±0	17±1	18±0	19±1	20±0	20±0
<i>P. fluorescens</i> P26	8±0	10±0	14±0	16±0	18±0	20±0	20±0	22±0	23±1	24±0
<i>P. stutzeri</i> P40	10±0	12±0	14±0	16±0	16±0	18±0	20±0	22±0	23±1	24±0
<i>P. putida</i> P41	10±0	12±0	14±0	16±0	18±0	19±1	20±0	20±0	21±1	22±0
<i>P. mendocina</i> P45	11±1	15±1	16±0	16±0	18±0	20±0	22±0	22±0	24±0	24±0

Tablo 4.26 *Pseudomonas* suşlarının farklı CdCo konsantrasyonlarına karşı göstermiş oldukları inhibisyon zon çapları (mm : çap)

Suş adı	CdCo (mmol/L)									
	10	25	50	100	150	200	250	300	400	500
<i>P. aeruginosa</i> P16	10±0	14±0	16±0	16±0	18±0	20±0	21±1	22±0	24±0	24±0
<i>P. fluorescens</i> P26	13±1	16±0	18±0	20±0	22±0	22±0	23±1	24±0	25±1	26±0
<i>P. stutzeri</i> P40	17±1	20±0	21±1	22±0	24±0	24±0	24±0	26±0	26±0	26±0
<i>P. putida</i> P41	10±0	12±0	13±1	15±1	16±0	19±1	20±0	22±0	22±0	22±0
<i>P. mendocina</i> P45	12±0	14±0	16±0	18±0	20±0	21±1	22±0	22±0	24±0	24±0

Tablo 4.27 *Pseudomonas* suşlarının farklı CoCr konsantrasyonlarına karşı göstermiş oldukları inhibisyon zon çapları (mm : çap)

Suş adı	CoCr (mmol/L)									
	10	25	50	100	150	200	250	300	400	500
<i>P. aeruginosa</i> P16	8±0	14±0	16±0	18±0	19±1	21±1	23±1	23±1	24±0	24±0
<i>P. fluorescens</i> P26	16±0	19±1	23±1	24±0	25±1	26±0	26±0	26±0	26±0	28±0
<i>P. stutzeri</i> P40	9±1	13±1	19±1	22±0	24±0	24±0	26±0	26±0	26±0	26±0
<i>P. putida</i> P41	10±0	14±0	16±0	17±1	20±0	20±0	21±1	22±0	22±0	22±0
<i>P. mendocina</i> P45	11±1	14±0	16±0	19±1	20±0	22±0	22±0	22±0	22±0	23±1

Tablo 4.28 *Pseudomonas* suşlarının farklı CdCrCo konsantrasyonlarına karşı göstermiş oldukları inhibisyon zon çapları (mm : çap)

Suş adı	CdCrCo (mmol/L)									
	10	25	50	100	150	200	250	300	400	500
<i>P. aeruginosa</i> P16	10±0	15±1	17±1	18±0	19±1	19±1	20±0	21±1	22±0	23±1
<i>P. fluorescens</i> P26	16±0	17±1	18±0	20±0	23±1	24±0	24±0	26±0	26±0	29±1
<i>P. stutzeri</i> P40	17±1	20±0	22±0	24±0	24±0	24±0	24±0	25±1	24±0	26±0
<i>P. putida</i> P41	10±0	12±0	14±0	16±0	18±0	19±1	20±0	20±0	21±1	22±0
<i>P. mendocina</i> P45	11±1	14±0	16±0	18±0	20±0	21±1	22±0	22±0	22±1	22±0

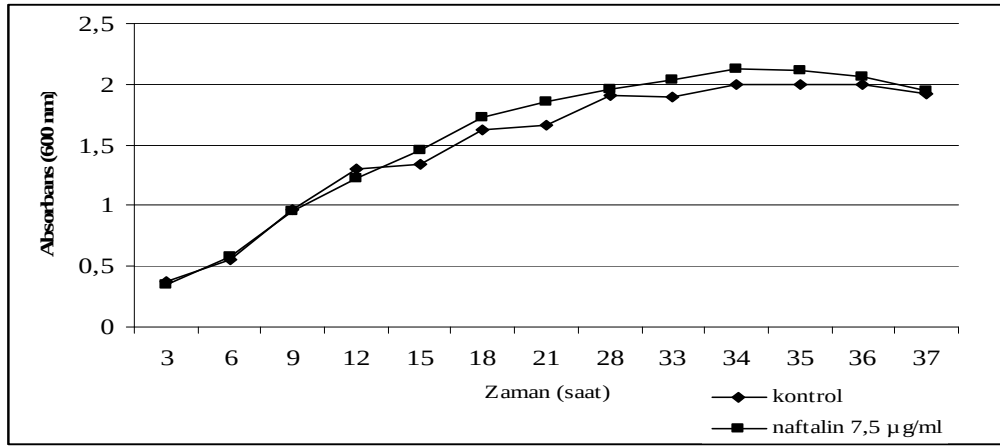
4.9. Naftalin Toleransı

Naftalinin 0,01; 0,02; 0,024; 0,03; 0,04; 0,05; 0,1; 0,2; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 3,5; 4,0; 4,5; 5,0; 5,5; 6,0; 6,25; 6,5; 6,75; 7,0; 7,25; 7,5; 8,0; 9,0; 10 ve 12,5 µg/ml aralığındaki konsantrasyonları kullanılarak belirlenen MİK değerleri Tablo 4.29’da verilmiştir.

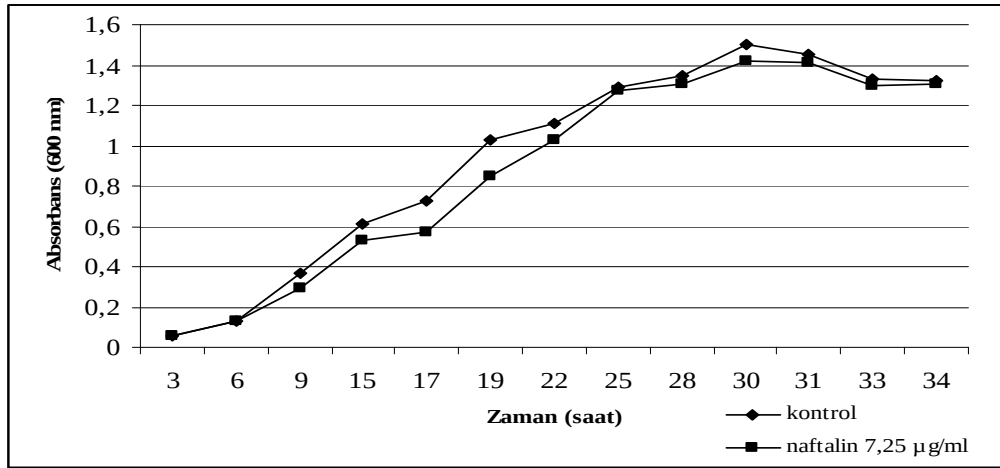
Tablo 4.29 *Pseudomonas* suşlarının MİK değerleri

Suş adları	MİK değeri (µg/ml)
<i>P. aeruginosa</i> P16	7,5
<i>P. aeruginosa</i> P22	7,25
<i>P. putida</i> P18	7,25
<i>P. putida</i> P41	5,0
<i>P. putida</i> P43	5,5
<i>P. stutzeri</i> P19	7,25
<i>P. stutzeri</i> P27	7,5
<i>P. stutzeri</i> P39	7,5
<i>P. stutzeri</i> P40	7,5
<i>P. stutzeri</i> P44	6,25
<i>P. stutzeri</i> P46	6,25
<i>P. fluorescens</i> P26	7,0
<i>P. mendocina</i> P45	6,25

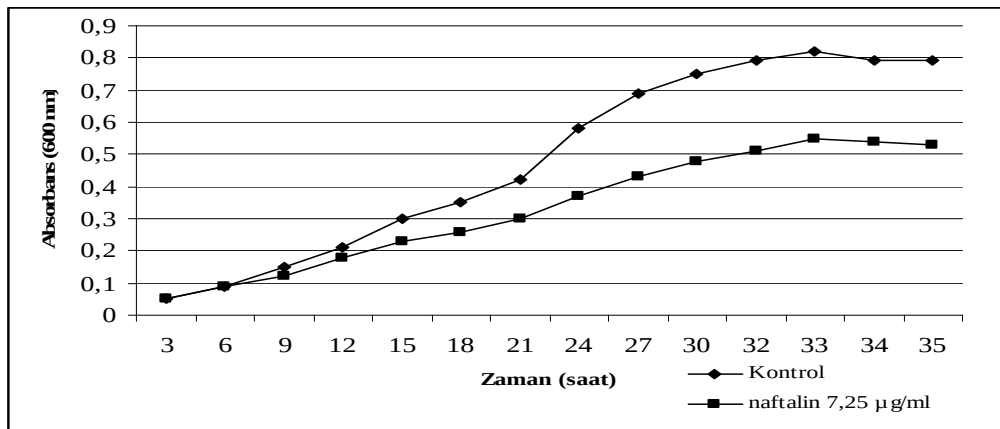
Belirlenen MİK değerlerinde naftalin içeren besi ortamında geliştirilen *Pseudomonas*’ların gelişim eğrileri Şekil 4.5, 4.6, 4.7, 4.8, 4.9, 4.10, 4.11, 4.12, 4.13, 4.14, 4.15, 4.16 ve 4.17’de verilmiştir.



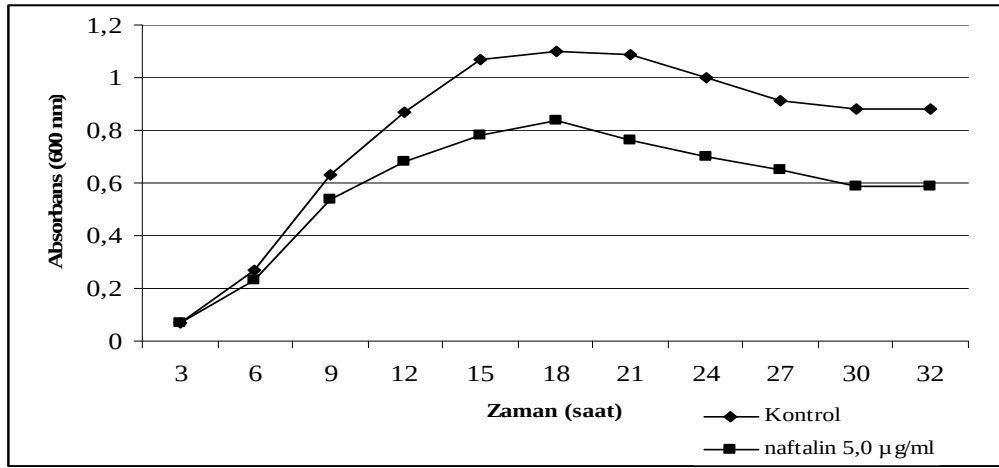
Şekil 4.5 7,5 µg/ml naftalin varlığında *P. aeruginosa* P16 bakterisinin gelişim eğrisi



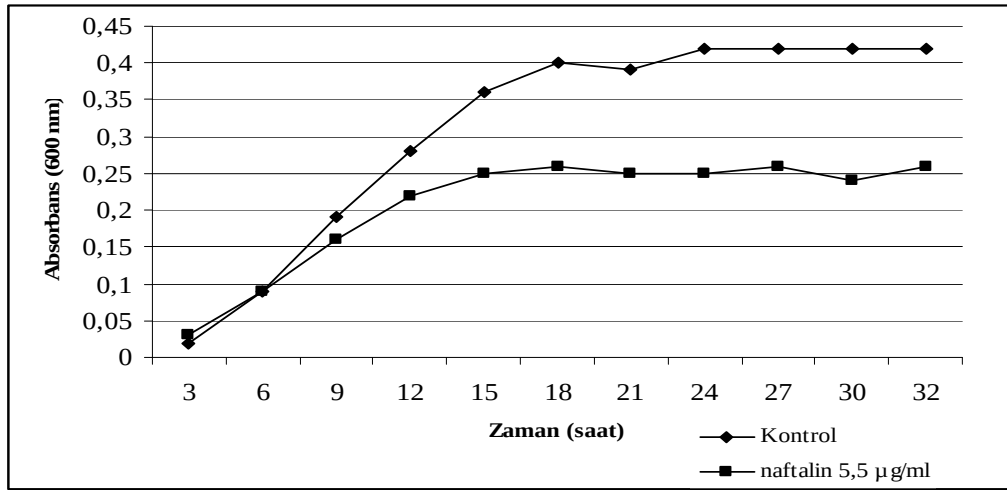
Şekil 4.6 7,25 µg/ml naftalin varlığında *P. aeruginosa* P22 bakterisinin gelişim eğrisi



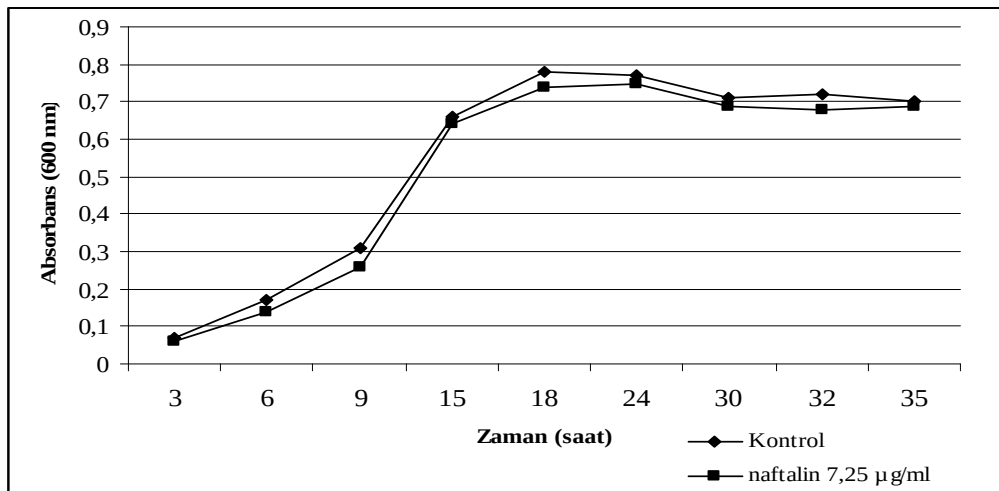
Şekil 4.7 7,25 µg/ml naftalin varlığında *P. putida* P18 bakterisinin gelişim eğrisi



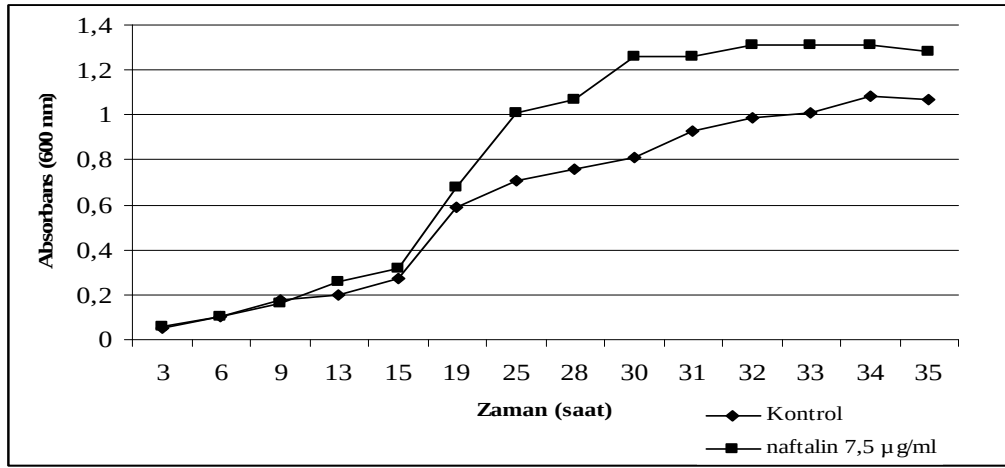
Şekil 4.8 5,0 µg/ml naftalin varlığında *P. putida* P41 bakterisinin gelişim eğrisi



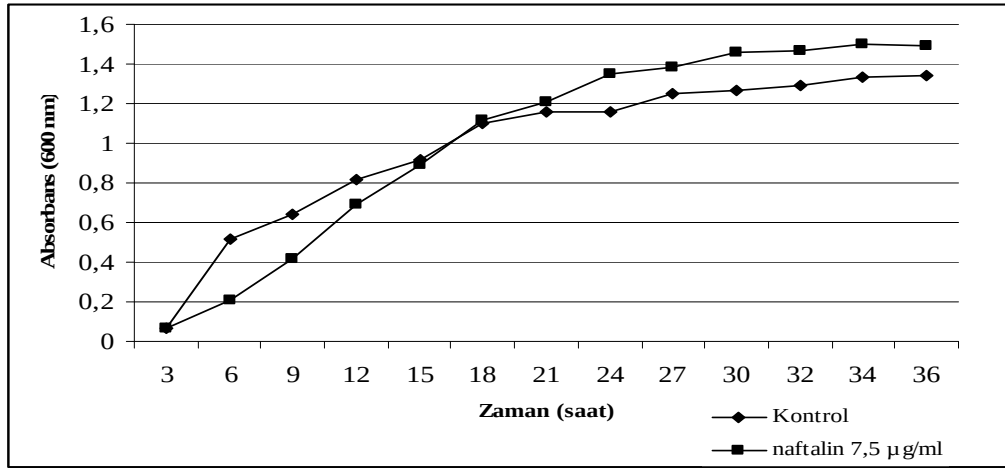
Şekil 4.9 5,5 µg/ml naftalin varlığında *P. putida* P43 bakterisinin gelişim eğrisi



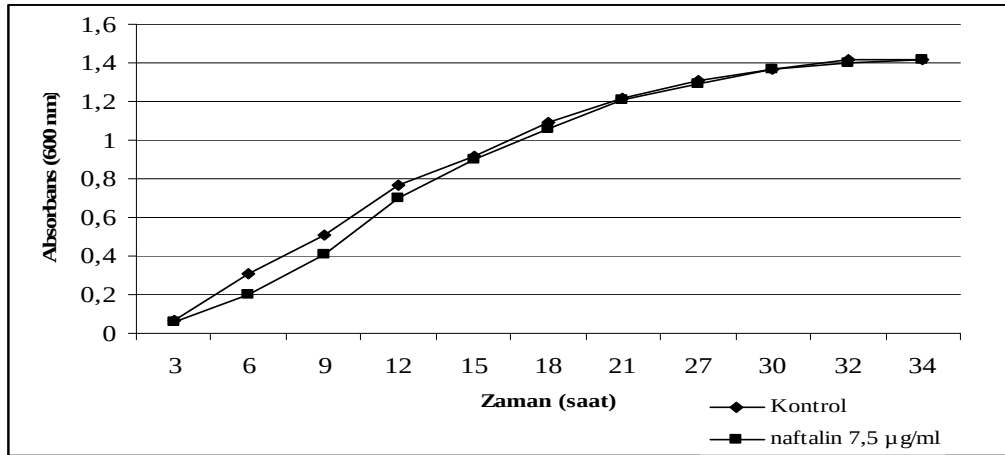
Şekil 4.10 7,25 µg/ml naftalin varlığında *P. stutzeri* P19 bakterisinin gelişim eğrisi



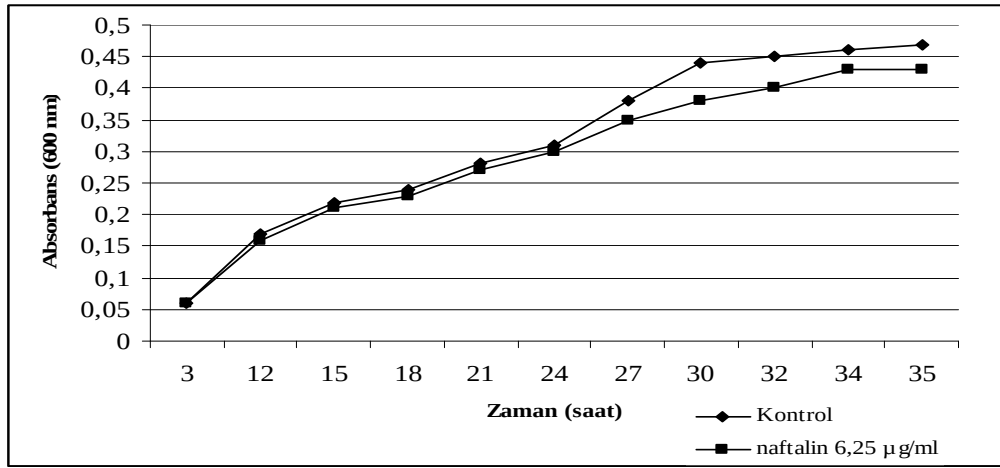
Şekil 4.11 7,5 µg/ml naftalin varlığında *P. stutzeri* P27 bakterisinin gelişim eğrisi



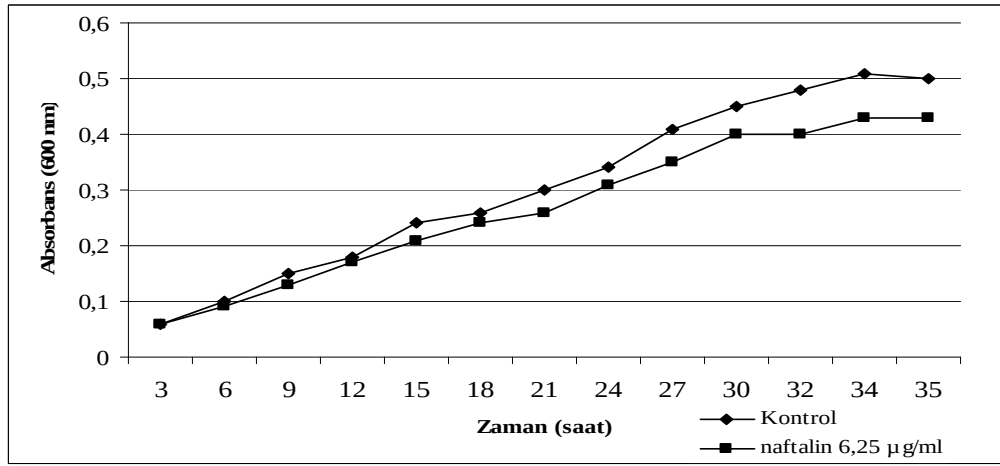
Şekil 4.12 7,5 µg/ml naftalin varlığında *P. stutzeri* P39 bakterisinin gelişim eğrisi



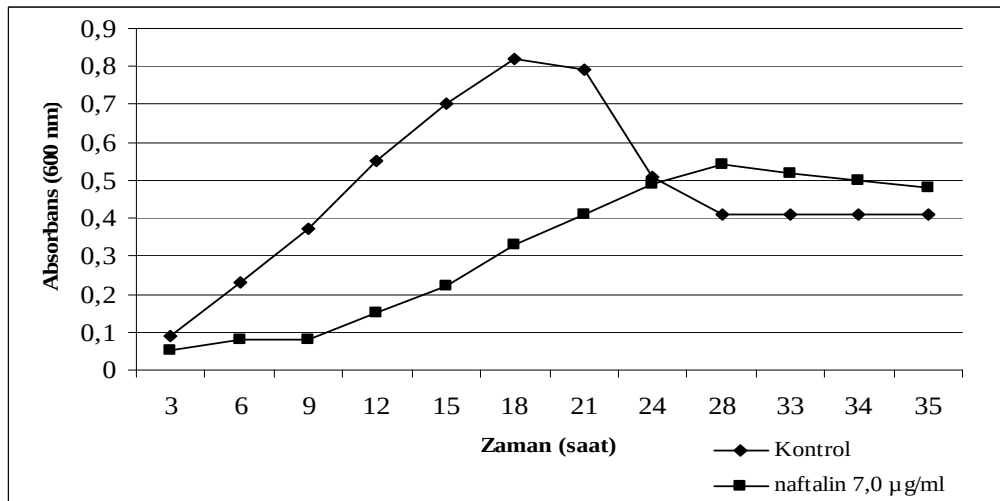
Şekil 4.13 7,5 µg/ml naftalin varlığında *P. stutzeri* P40 bakterisinin gelişim eğrisi



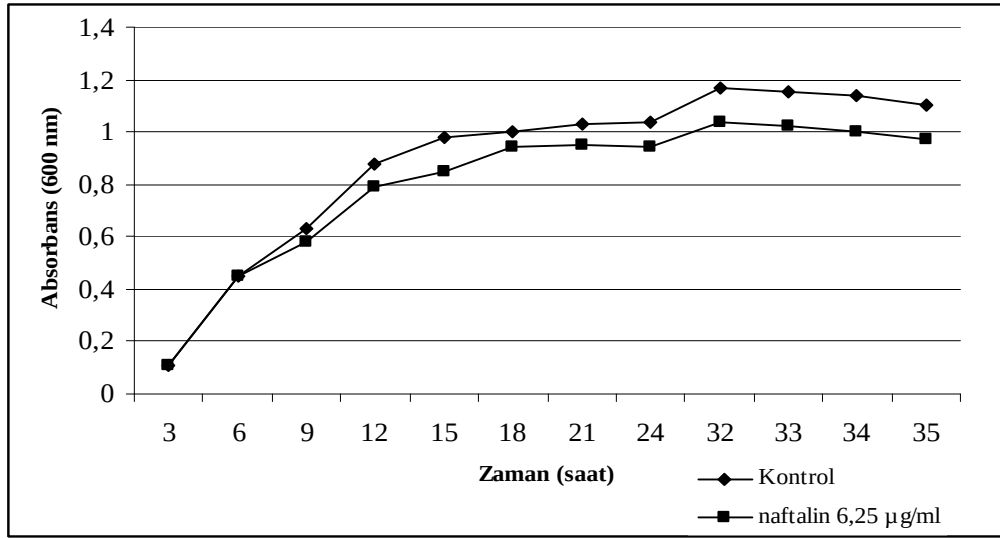
Şekil 4.14 6,25 µg/ml naftalin varlığında *P. stutzeri* P44 bakterisinin gelişim eğrisi



Şekil 4.15 6,25 µg/ml naftalin varlığında *P. stutzeri* P46 bakterisinin gelişim eğrisi



Şekil 4.16 7,0 µg/ml naftalin varlığında *P. fluorescens* P26 bakterisinin gelişim eğrisi



Şekil 4.17 6,25 µg/ml naftalin varlığında *P. mendocina* P45 bakterisinin gelişim eğrisi

5. TARTIŞMA

Çalışmada kullanılan 23 adet bakteri, toprak, su ve ölü embriyo içeren kaplumbağa yumurtalarından izole edilmiştir (Bkz. Tablo 3.1 ve 4.3). İzole edilen suşların tanımlanması, çeşitli fizyolojik ve biyokimyasal testler yardımıyla yapılmıştır. Ayrıca suşların pigment üretimleri tespit edilerek, oksidaz ve katalaz özellikleri belirlenmiştir (Bkz. Tablo 4.1, 4.2, 4.3, 4.4, 4.5 ve 4.6).

Bakterilerin, biyokimyasal özellikler açısından çeşitlilik gösterebileceği ve bu gibi özelliklere bakılarak cins içinde bazı türlerin gruplanabileceği bilinmektedir. Buna ilaveten aynı türe ait suşlar arasında da farklılıklar olabileceği yönünde de kuşku yoktur. Bakterilerin tür seviyesinde teşhis ve tanımlanması için API 20NE identifikasyon kiti kullanılmıştır (Richard ve Vogel 1999). Bu testlerin sonucunda izole edilen 23 adet bakteriden sadece 13 adedinin *Pseudomonas* cinsine ait türler olduğu tespit edilmiştir. Bunlardan 6 adedinin *Pseudomonas stutzeri* suşu (P19, P27, P39, P40, P44, P46), 2 adedinin *Pseudomonas aeruginosa* (P16, P22), 1 adedinin *Pseudomonas fluorescens* (P26) ve 1 adedinin *Pseudomonas mendocina* (P45) olduğu belirlenmiştir. İzole edildikleri kaynak ve bölgeler dikkate alındığında *P. stutzeri* türünün izole edilen diğer türlere kıyasla daha geniş bir izolasyon kaynağına sahip olduğu söylenebilir. *P. stutzeri* suşları, zeytinyağı fabrika toprak örneklerinden, Korucuk ve Güzelköy derelerinden ve atık arıtım tesislerinden alınan su örneklerinden izole edilmiştir. İzole edilen suşların tür oranına bakıldığında izolatların %26'sını *Pseudomonas stutzeri*, %13'ünü *Pseudomonas putida*, %9'unu *Pseudomonas aeruginosa*, %4'ünü *Pseudomonas fluorescens*, %4'ünü *Pseudomonas mendocina*, %4'ünü *Aeromonas hydrophila/caviae* ve %22'sini *Chryseomonas luteola* oluşturmuştur. Toplam 23 izolat arasında %4'ünün API identifikasyon kiti ile tanımlanamadığı belirlenirken %13'lük kısmı yetersiz tanımlanan izolatlar olarak değerlendirilmiştir (Bkz. Tablo 4.3).

Pseudomonas cinsi bakterilerin sınıflandırılmasında, Gram-negatif ve çubuk formunda olmaları, endospor oluşturmamaları ve hareketli olmaları önemli yer tutmasına rağmen, türlerin ayrımının güç olduğu ve yanlış tanımlamalar yapılabileceği bilinmektedir. Yüksek derecedeki heterojenite ve karbon kaynaklarını kullanma

özelliklerindeki farklılıklar standart testler ile tanımlamayı zorlaştırmaktadır. Cinsin sahip olduğu geniş fenotipik çeşitliliğin aynı zamanda geniş bir filogenetik dağılıma neden olduğu ve gelişmiş moleküler tekniklerle elde edilen moleküler kriterlerin organizmaların gruplandırılmasında esas yeri teşkil ettiği de belirtilmiştir (Tayeb vd 2005). Bu nedenle çalışmada %17'lik kısmın yeterli identifiye edilememesi beklenen bir sonuçtur.

Oksidaz testi, izole edilen bütün *Pseudomonas* suşlarında pozitif olarak tespit edilmiştir. Mohan vd (2003) çalışmalarında kullandıkları *Pseudomonas* suşlarının oksidaz pozitif olduklarını rapor etmişlerdir.

Bakterilerin katalaz ve hemolitik aktivite sonuçları incelendiğinde türler arasında *P. aeruginosa* P16 suşunun en güçlü katalaz aktivitesi ve hemolitik aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. Ayrıca bakterinin besiyeri pH aralığı 6,5–8,0, inkübasyon sıcaklığı 28–42°C aralığında ve %0,5-1,0 oranında NaCl içeren NB'de bakterinin pigment üretiminin arttığı tespit edilmiştir. Kanner vd (1978) besi ortamının bileşimi, pH'sı, sıcaklığı ve inkübasyonun çalkalamalı ya da sabit etüvde yapılmasının pigment üretimini etkileyen faktörler olduğunu rapor etmiştir. Yapmış olduğumuz çalışmada pH'sı 6,8 olan ve %0,5 NaCl içeren NB'de *P. putida* P41'in 25-30°C arasında *P. mendocina* P45'in ise 25-35°C arasında hafif sarımsı renkte pigment oluşturduğu tespit edilmiştir. Ayrıca 300–500 mmol/L oranında bakır içeren besi ortamında *P. aeruginosa* P16 suşunun mavi renk oluşturduğu tespit edilmiştir. Silver (1998)'in yaptığı çalışma bu bulguyu desteklemektedir. Yapılan çalışmada yüksek oranda bakır içeren ortamlarda *Pseudomonas* suşları mavi, renk oluştururken, *Xanthomonas* ve *E. coli*'nin kahverengi koloni oluşturduğu bildirilmiştir (Silver 1998). Çalışmamızda, inkübasyon sıcaklığı, süre, çalkalamalı inkübasyon vs. gibi inkübasyon şartlarına bağlı olarak bakterilerin pigment üretim özelliklerinin değiştiği de gözlenmiştir.

P. putida P18 ve *P. stutzeri* P19 katalaz negatif suşlar olarak tespit edilmiştir. *P. putida* P43, *P. stutzeri* P44, *P. stutzeri* P46 ve *P. mendocina* P45 suşları düşük katalaz reaksiyonu vermekle birlikte diğer *Pseudomonas* suşları daha güçlü bir katalaz reaksiyonu göstermişlerdir (Bkz. Tablo 4.1).

İzole edilen *Pseudomonas* suşlarından *P. stutzeri* P27 kanlı agarda β -hemolitik aktivite göstermiştir. *P. stutzeri* P39 suşu 24 saatlik inkübasyon sonunda hemolitik

aktivite göstermezken, 48 saatlik inkübasyon sonunda güçlü α -hemolitik aktivite göstermiştir. Diğer *Pseudomonas* suşlarının 24 ve 48 saatlik hemoliz testi sonucunda non-hemolitik oldukları tespit edilmiştir. Bruins vd (2000a) yapmış oldukları çalışmada hemolitik aktivite göstermeyen *P. picketti* suşunu izole etmişlerdir.

Pseudoalteromonas issachenkonii KMM 3549^T suşunun jelatinaz ve kazeinaz dahil proteinaz, lipaz, DNaz ve glikosidaz ürettiği ve hem bakteriyolitik hemde hemolitik aktiviteye sahip olduğu rapor edilmiştir (Ivanova vd 2002). Alexeeva vd (2003) aynı bakterinin hemolitik aktivitesini ve gelişim kinetiğini incelemiştir. *P. issachenkonii* suşunun hemolizin üretiminin besiyeri kompozisyonu ve inkübasyon zamanına bağlı olduğunu bildirmişlerdir.

API 20 NE identifikasyon kiti ile yapılan biyokimyasal testlerin sonuçlarına göre, *P. putida* P18 ve *P. putida* P43'ün nitrata indirgeyemediği, *P. putida* P41 ve izole edilen diğer *Pseudomonas* suşlarının nitrata indirgeyebildiği tespit edilmiştir. Yapılan bir çalışmada da *P. putida*'nın nitrata indirgeyemediği bildirilmiştir (Cowan vd 1974). İzole edilen tüm *Pseudomonas* suşları için indol ve glukozdan asit üretimi, üre, eskülin ve p-nitrofenil- β -D-galaktopiranosit negatif, glukoz kullanımı, glukonat, kaprat malat ve sitrat testi pozitif olarak bulunmuştur (Bkz. Tablo 4.2). Cowan vd (1974) tarafından *P. aeruginosa*, *P. stutzeri*, *P. putida*, *P. fluorescens* ve *P. mendocina* suşlarının glukozdan asit ürettiklerini rapor etmişlerdir.

P. stutzeri P44 ve *P. stutzeri* P46 suşlarının arginin testi negatif iken *P. stutzeri* P27, *P. stutzeri* P39 ve *P. stutzeri* P40'ın pozitif olarak bulunmuştur. Çalıştığımız *Pseudomonas* suşları arasında sadece *P. aeruginosa* P16 ve *P. aeruginosa* P22'nin jelatin testi pozitif olarak tespit edilmiştir. Cowan vd (1974) tarafından *P. aeruginosa* suşlarının jelatin testinin pozitif olduğu *P. stutzeri*, *P. putida*, *P. fluorescens* ve *P. mendocina*'nın bu test yönünden negatif oldukları bildirilmiştir.

P. putida P41'in arabinoz testi, *P. aeruginosa* P16'nın N-asetil glukozomin testi ve adipat testi pozitif olarak bulunurken diğer *Pseudomonas* suşlarının bu testleri negatif olarak değerlendirilmiştir.

P. aeruginosa P16, *P. putida* P18, *P. fluorescens* P26, *P. putida* P41, *P. putida* P43 ve *P. mendocina* P45'in maltoz testi negatif, *P. aeruginosa* P22 ve *P. stutzeri* suşlarının (P19, P27, P39, P40, P44 ve P46) maltoz testi pozitif olarak bulunmuştur. *P. putida*

P41, *P. putida* P43, *P. stutzeri* P44, *P. mendocina* P45, *P. stutzeri* P46'nın mannitol testi negatif, *P. fluorescens* P26, *P. aeruginosa* (P16, P22), *P. putida* P18 ve *P. stutzeri* P39, *P. stutzeri* P40 suşlarının mannitol testi pozitif olarak değerlendirilmiştir (Bkz. Tablo 4.2).

P. stutzeri suşlarının tamamı (P19, P27, P39, P40, P44, P46), *P. aeruginosa* suşları (P16, P22), *P. mendocina* P45 ve *P. putida* P43 suşu mannozu kullanamazken *P. putida* P18, *P. putida* P41 ve *P. fluorescens* P26 suşu mannozu kullanabilmiştir. İzole edilen *P. putida* suşlarının (P18, P41 ve P43) tamamının fenil-asetat testi pozitif, diğer *Pseudomonas* suşlarının fenil-asetat testi negatif olarak tespit edilmiştir.

Artan tuz yoğunluğuna bağlı olarak *P. stutzeri* P27 gelişiminin zayıfladığı, %0,5-%2,0 tuz aralığında *P. aeruginosa* P22 ve *P. fluorescens* P26, *P. mendocina* P45 gelişiminin arttığı gözlenmiştir. Hatta *P. fluorescens* P26 %1,5-2,0 oranında tuz içeren ortamda çok daha iyi gelişebilmektedir. %0,5; %1,0; %1,5 ve %2,0 tuz konsantrasyonlarının diğer *Pseudomonas*'ların gelişimini etkilemediği tespit edilmiştir. Cowan vd (1974) denizden izole edilen türlerin en az %1 oranında tuz gereksinimlerinin olduğunu, toprak ve tatlı sulardan izole edilen türlerin tuz gereksinimlerinin olmadığını bildirmiştir. %3,0 ve %4,0 tuz konsantrasyonunda *P. putida* P43 suşu gelişemezken *P. putida* P41, *P. fluorescens* P26 ve *P. mendocina* P45 suşlarının gelişimlerinde düşme olduğu gözlenmiştir (Bkz. Tablo 4.4).

P. putida P43, *P. stutzeri* P19 ve *P. stutzeri* P39'un pH 5,5 de zayıf geliştiği, *P. stutzeri* P44 ve *P. stutzeri* P46'nın pH 6,0 ve altındaki değerlerde gelişemediği tespit edilmiştir. *P. stutzeri* P44'ün pH 6,5 de ve pH 9,0'da zayıf geliştiği belirlenmiştir (Bkz. Tablo 4.5). Tüm *Pseudomonas* suşlarının nötüre yakın hafif alkali (pH 7,0-7,5) ortamda daha iyi gelişebildiği tespit edilmiştir. Yapılan bir çalışmada *Pseudomonas* suşlarının genelde nötüre yakın ve hafif alkali ortamları tercih ettiği tespit edilmiştir (Cowan vd 1974). Ayrıca çalışmada kullandığımız *Pseudomonas*'lar arasında *P. stutzeri* suşlarının (P19, P39, P44, P46) düşük pH değerlerine daha duyarlı oldukları da belirlenmiştir. pH değişimine karşı en dirençli suş olarak da pH 6,0-9,0 aralığında gelişme kaybı olmayan *P. putida* P41 tespit edilmiştir (Bkz. Tablo 4.5).

Pseudomonas suşları arasında +4 °C'de sadece *P. putida* P41 üreme gösterirken, bu suşun 41, 42, 45 ve 50°C de üreyemediği bulunmuştur. Cowan vd (1974) tarafından *P.*

putida suşunun 41°C’de gelişemediği *P. aeruginosa* suşunun ise bu sıcaklık değerinde gelişebildiği rapor edilmiştir. Suşlar arasında sadece *P. putida* P43’ün 10°C’de gelişemediği belirlenmiştir. 45 ve 50 °C’de sadece *P. fluorescens* P26 suşunda üreme görülürken diğer suşların bu sıcaklık değerlerinde gelişemedikleri tespit edilmiştir (Bkz. Tablo 4.6).

Antibiyotikler içinde en zayıf aktivite cefoclor, cefuroxime, cephalothin, cefadroxil, novabiocin, ampicillin, vankomisin, cefoxitin, gentamisin, clindamycin, oxacillin ve teicoplanin antibiyotikleri tarafından sağlanmış olup, *Pseudomonas* suşlarının tamamının belirtilen antibiyotiklere karşı dirençli oldukları tespit edilmiştir (Bkz. Tablo 4.7 ve 4.8).

Yapılan antibiyotik dirençlilik testlerinde en yüksek oranda dirençlilik tablosunu *P. putida* P41 suşu göstermiştir. Bu suşa karşı neredeyse tüm antibiyotikler etkisiz kalmış ve çeşitli antibiyotik gruplarına karşı dirençli olarak tespit edilmiştir.

Genel olarak bakterilerin β -laktam grubu antibiyotiklere göstermiş oldukları direnç yanı sıra bu grup antibiyotiklerden özellikle imipeneme karşı duyarlılık tespit edilmiştir. Isenberg vd (1999) *Pseudomonas* spp. suşlarının %90 oranında imipeneme duyarlı olduklarını bildirmişlerdir. Yine Speciale vd (2000) yaptıkları çalışmada kullandıkları tüm *Pseudomonas* türlerine ait suşların imipeneme duyarlı olduğunu bildirmişlerdir. Bu çalışma sonuçları göz önüne alındığında imipenem antibiyotiğinin yüksek etkisi çalışma sonuçlarımızla bir kez daha ortaya konmuştur.

Çalışmada, *P. aeruginosa* P16 ve *P. putida* P43 suşlarının aminoglikozidlerden tobramisine karşı duyarlı oldukları bulunurken, yine aminoglikozid grubu antibiyotik olan gentamisine karşı tüm suşların direnç gösterdikleri tespit edilmiştir. Karlowsky vd (2002) araştırmalarında kullandıkları *Pseudomonas* türüne ait suşların %82,9’una aminoglikozid grubu antibiyotiklerden özellikle gentamisinin etkili olduğunu rapor etmişlerdir. Yine bir başka çalışmada Hancock ve Speert (2000) *P. aeruginosa*’nın aminoglikozid grubu antibiyotiklerden gentamisine karşı duyarlı olduklarını belirtmişlerdir. Shibl vd (1997) kullandıkları tüm *Pseudomonas* suşlarına aminoglikozidlerden gentamisin ve saftazidim antibiyotiklerinin etkili olduklarını bildirmişlerdir. Literatür bilgileri ile çalışma sonuçlarımız paralellik göstermemektedir.

Elde edilen sonuçlardan, izole ettiğimiz *Pseudomonas* türlerinin gentamisin ve tobramisine karşı direnç mekanizması geliştirdiği sonucuna varılmıştır.

Algun vd (2004) filorokinolon grubu antibiyotiklerden ciprofloxacın, norfloxacın, oflaxacin ve pefloxacın'ın hastane ortamından izole edilen *P. aeruginosa* suşları üzerine etkili olduğunu göstermişlerdir. Filorokinolan grubu antibiyotik olan ciprofloxacın antibiyotiğine *P. putida* P41 ile *P. stutzeri* P27 ve P39 suşları dirençli iken, bu antibiyotiğin diğer tüm suşlar üzerine etkili olduğu tespit edilmiştir.

Miranda ve Zemelman (2002) Şili tatlı su balıklarından elde ettikleri izolatlarla yaptıkları çalışmada bu suşların gentamisin dışındaki tüm aminoglikozidlere dirençli olduklarını, ampisiline %80 oranında, 3. kuşak sefalosporinlerden sefotaksime ise suşların yarısının dirençli olduğunu bildirmişlerdir. Aynı çalışmada suşların %90 oranında tetrasikline, %40 oranında kloramfenikole ve %30 oranında trimetoprim/sulfametaksazole dirençli olduğu rapor edilmiştir. Jensen vd. (2001), *Pseudomonas* türlerinin kloramfenikol ve tetrasikline direnç olduklarını rapor etmiştir. Bu sonuçlar çalışmamızın sonuçlarıyla benzerlik göstermektedir.

Krueger vd (2001) *S. maltophilia* suşlarıyla yaptıkları çalışmada suşların aztreonama karşı %85,7, imipeneme %90,5 oranında dirençlilik gösterdiklerini, bunun yanı sıra tikarsilin+klavulanik asit, trimetoprim+sulfametaksazole ve trovafloksasine karşı yüksek duyarlılık gösterdiğini rapor etmişlerdir. Bu çalışma sonuçları her ne kadar aynı türler arasında karşılaştırma olmamasına rağmen *Pseudomonas* cinsi ile ilişkili bakteriler olmaları açısından imipenem antibiyotiğine karşı duyarlılık sonuçlarında paralellik gösterse de diğer antibiyotiklerde farklılıklar göstermektedir.

Tedavi amacıyla kullanılan antibiyotiklerin sağladığı faydalar, sayı ve niteliklerinin artırılması için geniş ve ayrıntılı araştırmaların yapılmasına neden olmaktadır. Özellikle bakteriyel ve fungal kökenli hastalıkların tedavisinde kullanılan antibiyotiklerin, antimikrobiyal aktiviteleri tespit edilen bakterilerden elde edilmeleri ile ilgili olarak yürütülen bir çok araştırma vardır. Son yıllarda antibiyotiklere dirençli mikroorganizma sayısının arttığı düşünülürse, değişik antibiyotikler üreten yeni gen kaynaklarına duyulan gereksinim ve geniş antimikrobiyal aktiviteye sahip, etkili antibiyotikler üreten mikroorganizma tiplerinin araştırılmasının ne denli önemli olduğu anlaşılabilecektir

Düşük demir içeren ortamlarda birçok *Pseudomonas* suşunun antimikrobial özelliğe sahip siderofor ürettiği ve bu nedenle *Pseudomonas*'ların mikroorganizmalar üzerinde antimikrobiyal etkili olduğu belirtilmiştir (Torres-Rubio vd 2000).

Torres-Rubio vd (2000), pirinç köklerinden izole ettikleri *Pseudomonas*'ların $FeCl_3$ içeren King B besiyerinde geliştirerek renkli sidereforlar izole edebilmiştir. *P.aeruginosa*, *P. putida* ve *P. fluorescens* den izole ettikleri sidereforların *Phytophthora infestans* fungusu üzerinde fungusid etki yaptığını belirlemişlerdir (Torres-Rubio vd 2000).

Vachee vd (1997) mineral sudan izole ettiği *Pseudomonas*'ların antimikrobial özellikte pigment ürettiklerini ve test mikroorganizmaları içerisinde en fazla *Staph. aureus*, *E. coli* ve *Aer. hydrophila* (Gram vd 2001) üzerine antimikrobiyal etki gösterdiklerini tespit etmişlerdir.

Çalışmamızda kullanılan *Pseudomonas* suşlarının gram pozitif bakteri, gram negatif kapsüllü ve kapsülsüz bakteri ile maya üzerine inhibisyon etkileri test edilmiştir. Buna göre *Pseudomonas* suşlarından sadece *P. aeruginosa* P16'nın gram pozitif bir bakteri olan *S. aureus* ATCC 25923 üzerine 16 ± 0 mm çapında antimikrobiyal etkisinin olduğu, *P. aeruginosa* P16 ve diğer tüm izolatların denenen gram pozitif, gram negatif kapsüllü ve kapsülsüz bakteriler ile mayalar üzerine antimikrobiyal etkisinin bulunmadığı tespit edilmiştir. Torres-Rubio vd (2000) yaptıkları bir çalışmada, bazı *Pseudomonas* türlerinin *S. aureus* bakterisi üzerine inhibisyon etkisi olduğunu, enterik bakterilere karşı ise antagonistik etkiye sahip olmadığını rapor etmişlerdir. Vachee vd (1997) tarafından da *Pseudomonas*'ların enterik bakteriler üzerine antimikrobiyal etkili olmadığı bildirilmiştir. Araştırmacıların bulguları yaptığımız çalışmayı doğrular niteliktedir.

Endüstrinin hemen her alanında kullanılan enzimler genellikle mikroorganizmalardan elde edilmektedir. Mikroorganizma kaynaklı enzimlerin kullanılması, katalitik aktivitelerinin bitkisel ve hayvansal kaynaklara göre çok yüksek olması, daha stabil, daha ucuz ve fazla miktarda elde edilebilmeleri en önemli nedenler arasında sayılabilir. Modern endüstrideki enzim uygulamaları, teknik ve ekonomik yönden çok önemli faydalar ve başarılar sağlamaktadır. Bu nedenle, mikrobiyal enzimlerin üretimi ve uygulanması dikkat çekmektedir (Chen vd 2003, 2004, Gessesse vd 2003).

Endüstriyel enzimlerin en önemli grubunu oluşturan proteazlar ve lipazlar; deterjan, besin, un sanayi, eczacılık, deri işlenmesi, ipek ve röntgen filmlerinden gümüş geri kazanımı, et yumuşatılması, organik sentez, protein geri kazanımı, kağıt endüstrisi veya sıvılaştırma gibi çeşitli endüstriyel uygulamalar için kullanılmaktadır (Chen vd 2003, 2004, Gessesse vd. 2003). Proteazlar ve lipazlar bakteri, küf ve maya gibi çok geniş bir grup tarafından üretilmektedir.

Çalışmamızda, Skim milk içeren besi ortamında agar spot ve agar-kuyu difüzyon yöntemi ile *Pseudomonas* suşlarının proteolitik aktiviteleri test edilmiş ve 4 adet *Pseudomonas* suşunda proteolitik aktiviteye rastlanmıştır (Bkz. Tablo 4.10). Bu suşlarda (*P. aeruginosa* P16, *P. aeruginosa* P22, *P. stutzeri* P19 ve *P. stutzeri* P27), proteolitik aktivite, inkübasyonun 24. saatinde zon çapı 2 ± 0 mm ve 8 ± 0 mm arasında bulunmuştur. En yüksek proteolitik aktivite, inkübasyonun 24. saatinde 8 ± 0 mm zon çapı ile *P. aeruginosa* P16'da tespit edilmiştir. Bakterideki proteolitik aktivitenin 48. saatte 14 ± 0 mm'ye ulaştığı görülmüştür (Bkz. Tablo 4.10). *P. fluorescens* P26, *P. mendocina* P45, *P. stutzeri* (P39, P40, P44 ve P46) ve *P. putida* (P18, P41 ve P43) suşlarının proteolitik aktiviteye sahip olmadıkları belirlenmiştir. Bu çalışmada *P. putida* P41 ve *P. fluorescens* P26 suşlarının proteolitik aktiviteye sahip olmadıkları tespit edilmiştir. Elde ettiğimiz bu sonuca paralel olarak, yapılan bir çalışmada, izole edilen *P. putida* suşlarının lipaz ve proteaz üretmediği rapor edilmiştir (Wiedmann vd 2000). Yine süt tanklarından izole edilen *P. fluorescens* bakterilerinin proteaz aktivitesine sahip olmadıkları birkaç araştırmacı tarafından bildirilmiştir (Wiedmann vd 2000, Wang ve Jayarao 2001).

Agar spot yöntemi kullanıldığında proteolitik aktivite gösteren *P. stutzeri* P19, *P. stutzeri* P27 ve *P. aeruginosa* P22 suşları agar-kuyu difüzyon yöntemi kullanıldığında proteolitik aktivite göstermemiştir. Agar-kuyu difüzyon yöntemi ile sadece *P. aeruginosa* P16 suşunun proteolitik aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. Bu yöntemde, elde edilen hidroliz zon çapının düştüğü de görülmüştür (Bkz. Tablo 4.10).

Çalışmada kullanılan *Pseudomonas* suşlarının tamamının tribütirin içeren katı besi ortamında lipolitik aktivite gösterdikleri tespit edilmiştir (Bkz. Tablo 4.11). Wang ve Jayarao (2001) lipolitik aktiviteye sahip *P. fluorescens* suşlarını tespit etmişlerdir. Yapılan bir diğer çalışmada ise *Pseudomonas* cinsine ait bütün suşların lipaz üretiminin

kalsiyum konsantrasyonu, pH ve sıcaklığa bağlı olduğu belirlenmiştir (Arpigny ve Jaeger 1999).

Kömür ve maden işletmeciliği, metal kaplama ve metal tel üretimi gibi çeşitli endüstri kuruluşlarının faaliyeti sonucu doğada toksik metal miktarı artmaktadır. Civa, kadmiyum, krom, bakır, nikel gibi metallerin canlılar üzerinde zararlı etkileri bulunmaktadır. Bu tür endüstriyel atıkları kimyasal çöktürme, oksidasyon-redüksiyon ve filtrasyon gibi çeşitli fizikokimyasal yöntemlerle ortamdan uzaklaştırmak mümkündür. Fakat bu yöntemler oldukça pahalı ve etkili olmayan yöntemler olarak kabul edilmektedir. Bu nedenle fizikokimyasal yöntemlere alternatif olarak ağır metal iyonlarının uzaklaştırılması amacıyla biosorbsiyon (biyolojik bağlama) ve bioakümülosyon (biyolojik biriktirme) gibi biyolojik metodlar geliştirilmiştir. Bu amaçla, ağır metallerin mikroorganizmalar tarafından absorblanmasına yönelik çalışmalar yoğunlaştırılmıştır (Hussein vd 2004).

Hassen vd (1998a) *P. aeruginosa* suşlarına karşı krom, bakır, çinko kobalt ve civa metallerinin toksik etkilerini araştırmışlar ve bu metallerin toksik etki yapan konsantrasyonlarını belirlemişlerdir. Bu çalışmada suşların krom, bakır, çinko ve kobalt metallerinin 1 mmolL⁻¹ konsantrasyonunda inhibe oldukları, civa metalinin ise 0,1 mmolL⁻¹ konsantrasyonunun toksik etkili olduğu bildirilmiştir. Ayrıca araştırmacılar bakır ve kromun bakteriler tarafından en iyi tolere edilebilen metaller olduğunu bildirmişlerdir. Bakır ve çinko bakteri gelişiminde temel metallerdir; ancak yüksek konsantrasyonlarda toksik etki gösterirler (Pardo vd 2003). Yapılan bir diğer çalışmada ise, klinik örneklerden izole edilen *Staphylococcus* cinsine ait bakterilerin Cr ve Pb'a dirençli, Ag'e ise duyarlı olduğu tespit edilmiştir (Uğur ve Ceylan 2003). Yaptığımız çalışmada elde edilen sonuçlara göre, çalışmada kullanılan ağır metaller içerisinde *Pseudomonas* suşlarına karşı en toksik metalin kobalt olduğu bulunmuştur. Kobaltın düşük konsantrasyonda dahi bakteriler üzerine etkili olduğu görülmüştür. Literatür bilgileri ile kıyaslandığında özellikle kobaltın *Pseudomonas* bakterileri üzerine toksik etkisinin varlığı paralellik göstermiştir.

P. aeruginosa P16 üzerine en az toksik etkiyi mangan göstermiştir. *P. aeruginosa* P16 bakterisinin, 10-500 mmol/L arasındaki mangan konsantrasyonlarına karşı çinkodan daha dayanıklı olduğu görülmüştür. Kurşunun 10 mmol/L'lik konsantrasyonu daha az toksik etki gösterirken, aynı metalin 500 mmol/L'lik konsantrasyonu *P.*

aeuruginosa P16 ve P22 suşları üzerine kobaltın oluşturduğu inhibisyon zonuna (27 ± 1 mm) yaklaşık bir inhibisyon zonu (26 ± 0 mm) oluşturmuştur (Bkz. Tablo 4.14 ve 4.20).

Elde edilen deney sonuçlarına göre, metallerin 300 mmol/L'lik konsantrasyonları baz alındığında, metallerin *P. aeruginosa* P16 üzerine etki dereceleri $Mn < Zn < Al < Cu < Cr = Ni < Cd = Co < Pb$ şeklinde bulunmuştur.

Çalışmada kullanılan *P. aeruginosa* P16 ve P22 suşlarının metal dirençlilikleri karşılaştırıldığında *P. aeruginosa* P22'nin kullanılan metallere karşı *P. aeruginosa* P16 bakterisinden daha duyarlı olduğu tespit edilmiştir. Kullanılan metallerin, 300 mmol/L'lik konsantrasyonları baz alındığında, *P. aeruginosa* P22 üzerine etki dereceleri $Al < Cu < Ni = Zn = Mn = Cd < Cr < Pb < Co$ şeklinde bulunmuştur.

P. putida suşlarının (P18, P43) üzerine en toksik metal kobalt olarak belirlenmiştir. *P. putida* P43 ve P41 suşları üzerine toksik etkisi en az olan metal mangan olarak tespit edilmiştir. *P. putida* P41 için 25 mmol/L'lik kurşun konsantrasyonu diğer metallere göre daha az toksik etkiye sahip iken 300-500 mmol/L'lik konsantrasyonu kullanıldığında kurşun en toksik metal olarak belirlenmiştir. Kullanılan metallerin, 300 mmol/L'lik konsantrasyonları baz alındığında, *P. putida* P41 üzerine etki dereceleri $Mn < Al < Cu < Ni = Zn < Cd < Cr = Co < Pb$ olarak belirlenmiştir. *P. putida* P41 genel olarak diğer *P. putida* suşlarına (P18, P43) göre yüksek konsantrasyondaki metal iyonlarına karşı daha dirençli olduğu tespit edilmiştir.

P. stutzeri suşları üzerine en etkili metal kobalt olarak belirlenmiştir. En fazla toksik etkinin 33 ± 1 mm'lik inhibisyon zon çapı ile *P. stutzeri* P19 üzerine, en az toksik etkinin ise 26 ± 0 mm'lik inhibisyon zon çapı ile *P. stutzeri* P27 ve P40 suşları üzerine olduğu tespit edilmiştir (Bkz. Tablo 4.20). *P. stutzeri* P27 ve P19 suşları için artan kurşun konsantrasyonlarının, kobalttan sonra daha toksik bir metal olduğu bulunmuştur. Metal iyonlarının 300 mmol/L'lik konsantrasyonları baz alındığında diğer *P. stutzeri* suşları (P39, P40, P44, P46) için kobalt ve kromdan sonra üçüncü derecede toksik metal kurşun olarak belirlenmiştir.

Kullanılan metaller arasında *P. fluorescens* P26 üzerine en az toksik etkiyi mangan, en fazla toksik etkiyi ise sırasıyla kadmiyum, kurşun ve kobaltın gösterdiği belirlenmiştir. Kullanılan metallerin, 300 mmol/L'lik konsantrasyonları baz alındığında, *P. fluorescens* P26 üzerine etki dereceleri $Mn = Al < Zn < Ni < Cu < Cr < Cd = Pb < Co$ olarak

belirlenmiştir. Yapılan bir çalışmada atık sulardan izole edilen *P. fluorescens*'in civa, bakır ve çinko varlığındaki gelişiminde kontrol grubuna göre önemli bir değişme olmadığı, ancak kadmiyum ve gümüşün varlığında suş gelişiminin kuvvetli inhibisyona uğradığı belirlenmiştir (Filali vd 2000). Bu çalışmaya paralel olarak, çalışmadan elde ettiğimiz sonuçlara göre de *P. fluorescens* P26 üzerine, kadmiyumun toksik etkisi çinko ve bakırdan daha yüksek bulunmuştur. *S. paucimobilis* suşlarının kadmiyum meteline karşı yüksek tolerans gösterdikleri Tangaromsuk vd (2002) tarafından rapor edilmiştir. Ayrıca Richau vd (1997) *S. paucimobilis* suşları ile yaptıkları çalışmada $0,5 \text{ mmolL}^{-1}$ bakır konsantrasyonunun bu suşlar için toksik olduğunu bulmuşlardır. Çalışmalarda kullanılan bakterilerin *Pseudomonas* cinsi ile ilişkili bakteriler olmasını göz önünde tutarsak, literatür bilgileri, çalışma sonuçlarımızı doğrulaması açısından önemli bulunmuştur.

P. mendocina P45 suşu üzerine manganın daha az etki ettiği belirlenmiştir. 300-500 mmol/L'lik metal konsantrasyonları kullanıldığında genel olarak *Pseudomonas* suşları üzerine kobalt, krom ve kurşun toksik etki gösterirken *P. mendocina* P45 suşu üzerine çinkonun kurşunla aynı derecede, kromdan ise daha yüksek toksik etki ettiği belirlenmiştir.

Yapmış olduğumuz çalışmada, mangan, çinko ve bakırın genel olarak *Pseudomonas* suşları üzerinde düşük inhibisyon zonu oluştururken krom, kobalt ve kadmiyumun ise daha büyük inhibisyon zonu oluşturduğu tespit edilmiştir.

Metal iyonları maden, organik, inorganik kimya, petrokimya, demir-çelik, metal temizleme, kaplama, elektrokaplama, metal işleme, otomobil parçaları üretimi, boya, tekstil ve gübre endüstrilerinde gelen atık sularda bir arada bulunurlar (Patterson 1977). Canlı hücrelerin, sulu çevrelerinden metal katyonlarını toplayarak, hücre içinde biriktirmeleri bilinen bir özellik olmasına rağmen, mikroorganizmaların ağır metal iyonlarını seçici olarak alıkoyma özelliği üzerindeki çalışmalar yenidir. Sınır değerlerin üzerindeki ağır metal derişimleri aktif çamur proseslerini de aktive etmektedir. Bu nedenle, atık sularda mevcut ağır metal iyonlarının biyolojik arıtma öncesi giderilmesi gerekmektedir (Sağ vd 1998).

Ağır metal iyonlarının mikroorganizmalar üzerine biyosorbsiyonu incelendiğinde, kullanılan mikroorganizmanın hücre yapısına bağlı olarak değişik mekanizmaların etkili

olduğu görülmektedir (Wilde ve Benemann 1993, El-Nady ve Atta 1996, Leborans ve Novillo 1996). Açıklanan en genel mekanizma, metal gideriminin iki basamaktan oluştuğu şeklindedir. Genellikle pasif giderim olarak adlandırılan, birinci basamak başlangıçta hızlı, fakat tersinir giderim basamağıdır. Genellikle aktif giderim olarak adlandırılan, ikinci basamak ise daha yavaş bir iç hücrel biyogiderim basamağı olup, metabolik aktivite ile ilişkilidir (Ting vd 1989, Aksu vd 1992). Ölü organizmalarla yapılan, adsorbsiyon işlemi genellikle biyosorbsiyon olarak tanımlanmaktadır (Tsezos ve Volesky 1981).

Aslında biyosorbsiyon, fiziksel ve kimyasal adsorbsiyon, iyon değişimi, kompleksleşme ve mikroçökme gibi pasif giderim prosesleri için kullanılan genel bir terim olarak düşünülebilir (Brady vd 1994). Mikroorganizmalara ağır metal iyonlarının tek türlerinin biyosorbsiyonunu etkileyen faktörler arasında; organizmanın özgül yüzey özellikleri, pH, sıcaklık, başlangıç metal iyon derişimi, biyokütle derişimi sayılabilir. Birden daha çok metal iyonunun mikroorganizmalara simultane bağlanmasını ise, metal kombinasyonu, metal derişim düzeyleri, metal eklenme sırası gibi daha birçok faktör etkiler. Belirli bir mikroorganizma türünün, belirli bir metal iyonunu adsorblama kapasitesi, ortamda başka bir metal varken, tek bileşenli duruma göre artabilir, azalabilir veya hiçbir değişim göstermez (Ting vd 1991, Avery ve Tobin 1993, Hu vd 1996). Birden çok ağır metal iyonunun, mikroorganizmalara yarışmalı ve/veya kısmi yarışmalı biyosorbsiyonu üzerine çok az sayıda çalışma yapılmıştır (Ting vd 1991, Pascucci ve Sneddon 1993, Pascucci 1993).

Ağır metal iyonları taşıdıkları teknolojik önem nedeniyle çeşitli endüstrilerde yaygın olarak kullanılmakta ve bu endüstrilerden gelen atıksular kalıcı toksik etkiye sahip ağır metal iyonlarını önemli miktarlarda içermektedirler. Ağır metal iyonlarının giderimi üzerine ülkemizde ve dünyada günümüze dek yapılan araştırmalar genellikle tek bileşenli sentetik sulu metal çözeltileriyle ilişkilidir (Tsezos ve Volesky 1981, Norberg ve Persson 1984, Wehrheim ve Wettern 1994, Sag ve Kutsal 1995, Bhide vd 1996). Oysa, atık sularda genellikle birden fazla metal iyonu bulunur ve bu metal karışımlarının giderimi konusunda en etkili yöntemler veya bakteriler araştırılmalıdır. Çalışmanın bu kısmında ülkemiz endüstriyel atık sularında sıklıkla bir arada bulunan, krom(VI) ve bakır (II) iyonları başta olmak üzere diğer ağır metal kombinasyonlarının bakteri türleri üzerine etkisi araştırılmıştır. Bu amaçla, metaller kendi aralarında az

toksik olanlar (mangan, çinko ve bakır) ve çok toksik olanlar (krom, kobalt ve kadmiyum) şeklinde sınıflandırılmış ve kombinasyonlar oluşturulurken, toksisitesi düşük olanlar kendi aralarında yüksek olanlar kendi aralarında kombineli olarak çalışılmıştır. Metal kombinasyonlarına karşı toleransda, türler arasında fark olup olmadığının belirlenmesi için *P. aeruginosa* P16, *P. fluorescens* P26, *P. stutzeri* P40, *P. putida* P41 ve *P. mendocina* P45 kullanılmıştır.

MnZn kombinasyonunun suşlar üzerine etkisine bakıldığında, *P. mendocina* P45 suşu üzerinde 150-400 mmol konsantrasyon aralığında MnZn kombinasyonunun oluşturduğu zon çapı 20 ± 0 mm bulunmuştur. MnCu'nun 300 mmol/L'lik konsantrasyonun *P. stutzeri* P40, *P. putida* P41 ve *P. mendocina* P45 suşları üzerinde zon artışına sebep olduğu, *P. aeruginosa* P16 ve *P. fluorescens* P26'da ise mangan ile bakırın tekli olarak oluşturdukları inhibisyon zon değeri arasında bir zon oluşmuştur (Bkz. Tablo 4.21).

CuZn'nin 300 mmol/L'lik konsantrasyonu, *P. aeruginosa* P16 ve *P. mendocina* P45 hariç *P. fluorescens* P26, *P. stutzeri* P40, *P. putida* P41 üzerinde inhibisyon zon çapının bu metallerin tekli uygulamalarına göre artmasına neden olmuştur (Bkz. Tablo 4.23).

MnZnCu üçlü metal kombinasyonunda ise *P. aeruginosa* P16 suşu üzerinde inhibisyon zonu 16 ± 0 mm olarak ölçülmüştür. Bulunan değer bakırın tekli olarak meydana getirdiği inhibisyon çapından küçük (20 ± 0 mm), çinko (12 ± 0 mm) ve manganın (8 ± 0 mm) oluşturduğu inhibisyon zon çapından büyük olduğu belirlenmiştir. Çinko ve mangan, bakırın *P. aeruginosa* P.16 suşu üzerinde yapmış olduğu toksik etkiyi inhibe ettiği görülmüştür (Bkz. Tablo 4.24).

P. fluorescens P26 üzerine üçlü metal kombinasyonlarının (MnZnCu) oluşturduğu zon çapı ile bakırın tek başına oluşturduğu zon çapı eşit olarak bulunmuştur. *P. stutzeri* P40 ve *P. putida* P41 üzerindeki zon çapının metallerin tekli uygulamalarına göre arttığı tespit edilmiştir. *P. mendocina* P45'de ise üçlü metal kombinasyonunun oluşturduğu inhibisyon zon çapı 21 ± 1 mm olarak ölçülmüştür. Bu değer 300 mmol/L'de bu suş için 22 ± 0 mm inhibisyon zon çapı oluşturan çinkonun etkisini 1 mm azalttığını göstermektedir (Bkz. Tablo 4.24).

CdCr'nin 300 mmol/L'lik konsantrasyonunda kadmiyum ve çinkonun birbirinin toksik etkisini azalttığı tespit edilmiştir. Çalışılan suşlardan *P. aeruginosa* P16 ve *P.*

fluorescens P26 üzerinde tekli metallerin oluşturduğu inhibisyon zon çapından daha düşük bir zon çapı elde edilmiştir. *P. stutzeri* P40, *P. putida* P41 ve *P. mendocina* P45 üzerine CdCr kombinasyonunun oluşturduğu inhibisyon zon çapları bu metallerin tekli olarak oluşturdukları inhibisyon zon çapları arasında olduğu bulunmuştur (Bkz. Tablo 4.25).

300 mmol/L'lik konsantrasyonda kullanılan kadmiyum-kobalt kombinasyonu, kadmiyum ve kobaltın tekli olarak uygulandığında *P. aeruginosa* P16, *P. fluorescens* P26 ve *P. mendocina* P45 üzerine oluşturdukları inhibisyon zon çapından daha düşük bir inhibisyon zon çapı oluşturduğu görülmüştür. *P. stutzeri* P40 ve *P. putida* P41'in üzerine oluşturdukları etki (26 ± 0 mm ve 22 ± 0 mm) kobaltın oluşturduğu inhibisyon zon çapı ile aynı bulunmuştur (26 ± 0 mm ve 22 ± 0 mm) (Bkz. Tablo 4.26).

Tekli uygulamalarında bu beş *Pseudomonas* suşu üzerine kobaltın inhibisyon zon çapı, kromun oluşturduğu inhibisyon zon çapından daha büyük bulunmuştur. Kobalt-krom kombinasyonunda elde edilen inhibisyon zon çapı ise bu metallerin tekli olarak uygulandığında oluşturduğu inhibisyon zon çapları arasında bulunmuştur. Örneğin *P. fluorescens* P26 üzerine krom 23 ± 1 mm, kobalt ise 32 ± 0 mm inhibisyon zon çapı oluşturmuştur. Krom-kobalt kombinasyonunda ise inhibisyon zon çapı 26 ± 0 mm olarak ölçülmüştür. Sadece *P. putida* P41 suşu üzerinde bu metallerin tekli ve ikili kombinasyonlarının oluşturduğu inhibisyon zon çapı 22 ± 0 mm olarak ölçülmüştür.

Kobalt çalışmada kullanılan beş *Pseudomonas* suşu üzerinde krom ve kadmiyuma göre oldukça yüksek inhibisyon zonu oluşturmuştur. Kadmiyum-krom-kobalt kombinasyonu kobaltın tekli olarak kullanıldığında oluşturduğu inhibisyon zon çapını düşürdüğü tespit edilmiştir. Hussein vd (2004), *Pseudomonas* bakterilerinin Cr, Cu, Cd ve Ni metallerini biyosorbsiyon yeteneklerini araştırmışlar ve metal kombinasyonlarından Ni ve Cu kombinasyonunda, metallerin birbirlerinin toksik etkilerini kapattıklarını bulmuşlardır.

Organik kontaminantlar, mikroorganizmalar tarafından mikrobiyal transformasyona uğratılmaktadır. Karbon kaynağı ve elektron verici olmak üzere mikroorganizmalar kontaminantları kullanmaktadır (Diaz 2004). *Achromobacter*, *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Flavobacterium*, *Nocardia* ve *Pseudomonas* cinslerine ait türlerin karasal ve sucul alanlardaki hidrokarbonları degrade

edebildiği rapor edilmiştir (Lehay ve Colwell 1990). Bakteriler, doğal yaşam ortamlarında kirleticileri enerji ve karbon kaynağı olarak kullanabilme yeteneğine sahiptirler. Ancak mikroorganizmaların degradatif özelliği çevre şartlarından etkilenmektedir. Bu nedenle kirliliğe sebep olan maddelerin daha etkili bir şekilde uzaklaştırılabilmesi için zorlu çevre şartlarında gelişimini sürdürebilen ve çok çeşitli substratları kullanabilen organizmaların elde edilmesine çalışılmaktadır (Bruins vd 2000a, Diaz 2004,).

Naftalinin bakteriyal biyodegradasyon mekanizmasının açığa kavuşturulması, daha karmaşık yapılı polisiklik ve heterosiklik aromatik hidrokarbonların nasıl metabolize edildiğinin belirlenmesi bakımından önem taşımaktadır. Bu amaçla Eaton ve Chapman (1992) naftalinin parçalanmasında gerekli olan ilk üç enzimi kodlayan NAH7 plazmidine sahip *P. aeruginosa* PAO1 suşunun naftalini metabolize mekanizmasını açıklığa kavuşturmaya çalışmışlardır.

Çalışmada kullandığımız *Pseudomonas* suşlarının karbon ve enerji kaynağı olarak naftalin içeren besi ortamında gelişimleri takip edilmiştir. Bu amaçla, öncelikle her suş için MİK değeri belirlenmiştir (Bkz. Tablo 4.29). Belirlenen MİK değerinde naftalin içeren NB’de suşların gelişim eğrileri çıkarılarak, kontrol grubu olan ve naftalin içermeyen NB’deki gelişim eğrileri ile karşılaştırılmıştır. Buna göre; 2 adet *P. aeruginosa* suşlarından (P16 ve P22) *P. aeruginosa* P16 bakterisinin 7,5 µg/ml naftalin varlığında kontrole göre daha yüksek bir gelişim eğrisine sahip olduğu belirlenmiştir (Bkz. Şekil 4.5). Bu durum naftalin varlığında bu suşun daha iyi geliştiğini göstermektedir. Whyte vd (1997) tarafından yapılan bir çalışmada kutup bölgesindeki topraklardan izole edilen *Pseudomonas* suşlarının (B17 ve B18) 5 ve 25°C’de alkan ve naftalini katabolik yolla parçaladıklarını tespit etmişlerdir. Bruins vd (2000a) izole ettikleri *P. picketti* Va-1, Va-2 ve Va-3 suşlarının klorlu fenoller, aromatik hidrokarbonlar, 2,4-dikloro fenoksiasetik asit ve pentasiklik triterpenoid gibi çeşitli toksik maddeleri degrade edebildiklerini, kadmiyum, bakır ve çinko gibi ağır metallere karşı da dirençli olduklarını tespit etmişlerdir. Ayrıca bu suşların kısıtlı besin ortamında da gelişebildiklerini göstermişlerdir. Bu araştırmacılar, ağır metal ve organik kontaminantla kirlenmiş alanların temizlenmesinde bu suşların da kullanılabileceğini rapor etmişlerdir. Çalışmada kullandığımız *P. aeruginosa* P16’nın mangan-çinko-bakır ve kadmiyum-krom-kobaltın ikili ve üçlü kombinasyonlarına karşı direnç göstermesi bu

suşun metal varlığında naftalinle kirlenmiş alanların temizlenmesinde kullanılabileceğini düşündürmektedir. *P. aeruginosa* P22 suşunun ise 7,25 µg/ml naftalin varlığındaki gelişim eğrisinin, naftalin içermeyen kontrol grubuna göre daha düşük olduğu bulunmuş ve bakteri gelişimi olumsuz yönde etkilenmiştir (Bkz. Şekil 4.6).

Çalışmada kullanılan 3 adet *P. putida* suşlarının (P18, P41 ve P43) naftalin içeren besi ortamında kontrol grubuna göre oldukça düşük bir gelişim eğrisine sahip oldukları tespit edilmiştir. Buna ilaveten *Pseudomonas* suşları arasında, naftalinin bakteri gelişimi üzerine olan olumsuz etkisi en çok *P. putida* suşlarında görülmüştür (Bkz. Şekil 4.7, 4.8 ve 4.9).

Çalışmada kullandığımız 6 adet *P. stutzeri* suşlarından (P19, P27, P39, P40, P44 ve P46) *P. stutzeri* P27 ve P39'un 7,5 µg/ml naftalin varlığındaki gelişim eğrilerinin kontrol grubuna göre daha yüksek olduğu, dolayısıyla bu suşların naftalin varlığında daha iyi geliştiği tespit edilmiştir (Bkz. Şekil 4.11 ve 4.12). *P. stutzeri* P19 ve P44'ün naftalin varlığında gelişim eğrilerinin kontrole göre düşük bulunması, naftalin içeren besiyerinde suşların üremelerinin zayıfladığını göstermektedir (Bkz. Şekil 4.10 ve 4.14). *P. stutzeri* P40 suşunun ise gelişim eğrisi kontrole yakın olarak tespit edilmiştir. Bu durum, *P. stutzeri* P40 suşunun naftalinden olumlu ya da olumsuz yönde etkilenmediğini göstermektedir (Bkz. Şekil 4.13).

P. fluorescens P26 suşunun 7,0 µg/ml naftalin varlığındaki gelişim eğrisi inkübasyonun ilk 24 saatinde naftalin içermeyen kontrol grubuna göre düşük bulunurken, 24 saatlik inkübasyondan sonra naftalinin bakteri gelişimini olumlu yönde etkilediği tespit edilmiştir (Bkz. Şekil 4.16). Çalışmamızda bu suşun mangan-çinko-bakır ve kadmiyum-krom-kobaltın ikili ve üçlü kombinasyonlarına karşı direnç gösterdiği de tespit edilmiştir. Filali vd (2000) bir endüstri şehri olan Morocco'nun Casablanca eyaletinde atık sulardan izole edilen *P. fluorescens*, *P. aeruginosa*, *K. pneumonia*, *Proteus mirabilis* ve *Staphylococcus* suşlarının ağır metaller ve antibiyotiklere karşı dirençli olduklarını, karbon kaynağı olarak naftalin, toluen ve benzeni kullanabildikleri tespit edilmiştir. Çalışmada kullandığımız *P. fluorescens* P26 suşunun, naftalin varlığındaki gelişim eğrisinin ilk 24 saatlik inkübasyonda naftalin içermeyen kontrol grubunun altında olması suşun ortama geç adapte olduğunu düşündürmüştür. Lee vd (2003), karbon kaynaklarının naftalin degradasyonu üzerine

olan etkisini araştırmışlar ve piruvat varlığında *P. putida* G7 suşunun naftalinli ortama daha çabuk adapte olabildiğini belirtmişlerdir.

P. mendocina P45 suşunun 6,25 µg/ml naftalin içeren besi ortamındaki gelişiminin kontrole göre düşük olması, naftalinin bakteri gelişimini olumsuz yönde etkilediğini göstermektedir (Bkz şekil 4.17). Farrel vd (2003) soğuk bölgelerden izole ettikleri *Pseudomonas* suşlarının düşük sıcaklık değerlerinde tek karbon kaynağı olarak tolueni kullanırken naftalini kullanamadıklarını tespit etmişler ve toluen ile kirlenmiş soğuk iklime sahip bölgelerin remedasyonunda bu suşların da kullanılabileceğini ne sürmüşlerdir.

6. SONUÇ

Endüstriyel atıkların sucul ortamlara deşarj edilmesi, meydana gelen kazalar sonucu organik içeriği fazla olan atıkların etrafa yayılması ve atıkların imha edildiği alanlardan çevreye sızması sonucu benzen, toluen, etilbenzen, ksilen, naftalin, nitrofenoller ve kloroform gibi aromatik hidrokarbonlar çevreye dağılmakta ve doğal dengeyi bozmaktadırlar. Bu kontaminantları parçalayan mikroorganizmaların belirlenmesi, izolasyonu ve karakterizasyonu çevrenin daha kısa bir sürede temizlenmesi açısından büyük önem taşımaktadır. Mikroorganizmaların biyodegradasyon özelliklerinin; pH, sıcaklık, tuzluluk, oksijen, besinsel içerik ve çeşitli metallerden olumsuz yönde etkilendiği bilinmektedir. Ağır metaller içerisinde özellikle civa, kadmiyum, bakır, çinko ve gümüş gibi metaller mikrobial degradasyonu engellemektedir.

Bu çalışmada farklı ortamlardan izole edilen *Pseudomonas* suşlarının ağır metal dirençlilik profilleri ve naftalin biyodegradasyonu araştırılmıştır. Çalışmalarımız sonunda elde edilen sonuçlara göre, *P. aeruginosa* P16 ve *P. fluorescens* P26 bakterileri kadmiyum-krom-kobalt ve mangan-çinko-bakır metallerinin kombinasyonlarına karşı direnç göstermektedir. Aynı bakteriler, naftalin içeren ortamda da gelişebilmektedirler. Buna ilaveten, metallerin tekli uygulamalarına karşı direnç gösterdiği belirlenen *P. stutzeri* P27 ve *P. stutzeri* P39 bakterilerinin de naftalin içeren besiyerinde gelişmesi dikkat çekicidir.

Bu konuda ileride yapılması hedeflenen çalışmalar, çeşitli metallere dirençli mikroorganizmalar aracılığıyla organik kontaminantlar ile kirletilmiş alanların biyoremedasyonunun (biyolojik iyileştirme) sağlanması yönündedir. Ön tarama niteliğinde olan deneylerimiz sonucunda elde edilen bilgiler, *P. aeruginosa* P16, *P. fluorescens* P26, *P. stutzeri* P27 ve *P. stutzeri* P39 nolu suşların daha detaylı araştırmalarda kullanılacak nitelikte olduğunu düşündürmektedir.

KAYNAKLAR

- ACC. (2002) Courtney M. Price, American Chemical Council, Arlington, VA letter to Dr. C. W. Jameson, National Toxicology Program, Research Triangle Park, NC, October 2, 2002. <http://dir.niehs.nih.gov/dirtob/rocpubcom/11throc/naphthalene/price-10-03-02.pdf>.
- Ajao, O. G., M. O. Adenuga and J. K. Ladipo (1998) Colorectal carcinoma in patients under the age of 30 years: a review of 11 cases. *J R Coll Surg Edinb* 33(5): 277-9.
- Aksu, Z., Sag, Y. and Kutsal, T. (1992) The Biosorption of Copper(II) by *C. vulgaris* and *Z. Ramigera*. ***Environ. Technol.***, 13: 579-86.
- Alexeeva, Y. V., Kalinovskaya, N. I., Kuznetsova, T. A. and Ivanova, E. P. (2003) Impact of Cultivations Conditions on Haemolytic Activity of *Pseudoalteromonas issachenkonii* KMM 3549^T. ***Letters in Appl. Microbiol.***, 38: 38-42.
- Algun, U., Arisoy, A., Gunduz, T. and Ozbakkaloglu, B. (2004) The Resistance of *Pseudomonas aeruginosa* Strains to Fluoroquinolone Group of Antibiotics. ***Ind. J. Med. Microbiol.***, 22(2): 112-114.
- Arpigny, J.L. and Jaeger, K.E. (1999) Bacterial Lipolytic Enzymes: Classification and Properties. ***Biochem. J.***, 343: 177-183.
- Avery, S.V. and Tobin, J.M. (1993) Mechanism of Adsorption of Hard and Soft Metal Ions to *Saccharomyces cerevisiae* Influence of Hard and Soft Anions. ***Appl. Environ. Microbiol.***, 59: 2851-6.
- Bano, N. and Musarrat, J. (2004) Characterization of a Novel Carbofuran Degrading *Pseudomonas* sp. with Collateral Biocontrol and Plant Growth Promoting Potential. ***FEMS Microbiology Letters.***, 231: 13-17.
- Baumann, L., Baumann, P. Mandel, M. and Allen, R.D. (1972). Taxonomy of Aerobic Marine Eubacteria. ***J. Bacteriol.***, 110(1): 402-429.
- Bhide, J.V., Dhakephalkar, P.K. and Paknikar, K.M. (1996) Microbiological Process for the Removal of Cr(VI) From Chromate-Bearing Cooling Tower Effluent. ***Biotech. Lett.***, 18: 667-72.
- Brady, D., Stoll, A. and Duncan, J.R. (1994) Biosorption of Heavy Metal Cations by Non-viable Yeast Biomass. ***Environ. Technol.***, 15: 429-38.
- Brown, N.L., Shih, Y.C., Leang, C., Glendinning, K.J. Hobman, J.L. and Wilson, J.R. (2002) Mercury transport and resistance. ***Biochem. Soc.***, 30: 715-718.

- Bruins, M.R., Kapil, S. and Oehme, F.W. (2000a) *Pseudomonas pickettii*: A Common Soil and Groundwater Aerobic Bacteria with Pathogenic and Biodegradation Properties. **Ecotox. Environ. Safe.**, 47: 105-111.
- Bruins, M.R., Kapil, S. and Oehme, F.W. (2000b). Microbial Resistance to Metals in the Environment. **Ecotox. Environ. Safe.**, 45: 198-207.
- Bruins, M.R., Kapil, S. and Oehme, F.W. (2003) Characterization of a Small Plasmid (pMBCP) from Bovine *P. pickettii* that Confers Cadmium Resistance. **Ecotox. Environ. Safe.**, 54: 241-248.
- Cabanes, F.J., Alonso, J.M., Castella, G., Alegre, F., Domingo, M. and Pont, S. (1997) Cutaneous Hyalohyphomycosis Caused by *Fusarium solani* in a Loggerhead Sea Turtle (*Caretta caretta* L.). **J. Clin. Microbiol.**, 35(12): 3343-3345.
- Carson, L.A., Favero, M.S., Bond, W.W. and Petersen, N.J. (1973) Morphological, Biochemical and Growth Characteristics of *Pseudomonas cepacia* from Distilled Water. **Appl. Microbiol.**, 25(3): 476-483.
- Castro-Escarpulli, G., Figueras, M.J., Aguilera-Arreola, G., Soler, L., Fernandez-Rendon, E., Aparicio, G.O., Guarro, J. and Chacon, M.R. (2003) Characterization of *Aeromonas* sp. Isolated From Frozen Fish Intended for Human Consumption in Mexico. **Int. J. Food Microbiol.**, 84: 41-49.
- Chang, B.V., W, W.B. and Yuan, S.Y. (1997) Biodegradation of Benzene, Toluene and Other Aromatic Compounds by *Pseudomonas* sp. D8. **Chemosphere.**, 35(12): 2807-2815.
- Chen, L., Daniel, R. M. and Coolbear, T. (2003) Detection and Impact of Protease and Lipase Activities in Milk and Milk Powders. **International Dairy Journal.**, 13: 255-275.
- Chen, L., Coolbear, T. and Daniel, R. M. (2004) Characteristics of Proteinases and Lipases Produced by Seven *Bacillus* sp. Isolated from Milk Powder Production Lines. **International Dairy Journal.**, 14: 495-504.
- Choudhury, R. and Srivastava, S. (2001) Zinc Resistance Mechanisms in Bacteria. **Curr. Sci.**, 81(7): 7.
- Collins C. H. (1995) In: Lyne, P.M., Grange, J.M. (Eds.), Microbiological Methods, 7th ed. **Butterworths**, London, p. 493.
- Cowan, S.T., Holt, J.G., Liston, J., Murray, R.G.E., Niven, C.F., Ravin, A.W. and Stanier, R.Y. (1974) Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, Buchanan, R.E. and Gibbons, N.E. (co-eds.), 8th ed., **The Williams and Wilkins Company.**, Baltimore, London, Part 7, p217-243.
- Diaz, E. (2004) Bacterial Degradation of Aromatic Pollutants: A paradigm of Metabolic Versality. **Int. Microbiol.**, 7:173-180.
- Eaton, R. W. and Chapman, P. J. (1992) Bacterial Metabolism of Naphthalene: Construction and Use of Recombinant Bacteria to Study Ring Cleavage of 1,2-

- Dihydroxynaphthalene and Subsequent Reactions. *J. Bacteriol.*, 174(23): 7542-7554.
- Ehrlich, H.L. (1997) Microbes and Metals. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 48: 687-692.
- El-Nady, F.E. and Atta, M.M. (1996) Toxicity and Bioaccumulation of Heavy Metals to Some Marine Biota from the Egyptian Coastal Waters. *J. Environ. Sci. Health*, A31: 1529-45.
- Emtiaza, G., Ethemadifar, Z. and Habibi, M.H. (2004). Production of Extra-cellular Polymer in *Azotobacter* and Biosorption of Metal by Exopolymer. *Afr. J. Biotech.*, 3(6): 330-333.
- Farrell, R.L., Rhodes, P.L. and Aislabie, J. (2003) Toluene-Degrading Antarctic *Pseudomonas* Strains from Fuel-Contaminated Soil. *Biochem. Bioph. Res. Co.*, 312: 235-240.
- Filali, B.K., Taoufik, J., Zeroual, Y., Dzairi, F.Z., Talbi, M. and Blaghen, M. (2000) Waste Water Bacterial Isolates Resistant to Heavy Metals and Antibiotics. *Curr. Microbiol.*, 41: 151-156.
- Fuller, A.T. and Mellows, G. (1971) Pseudomonic Acid: An Antibiotic Produced by *Pseudomonas fluorescens*. *Nature.*, 234: 416-417.
- Gavrilescu, M. (2004) Removal of Heavy Metals from the Environmental by Biosorption. *Eng. Life. Sci.*, 4(3): 219-232.
- Gazso, L.G. (2001) The Key Microbial Processes in the Removal of Toxic Metals and Radionuclides from the Environment. *Cejoem.*, 7(3-4): 178-185.
- Gessesse, A., Dueholm, T., Petersen, S. B. and Nielsen P.H. (2003) Lipase and protease extraction from activated sludge. *Water Research.*, 37: 3652-3657.
- Gram, L., Lovold, T., Nielsen, J., Melchiorson, J. and Spanggaard, B. (2001) In vitro Antagonism of the Probiotic *Pseudomonas fluorescens* Strain AH2 Against *Aeromonas salmonicida* does not Confer Protection of Salmon Against Furunculosis. *Aquaculture.*, 199: 1-11.
- Grinstead, D.A. and Barefoot, S.F. (1992) Jensenin G, a Heat-Stable Bacteriocin Produced by *Propionibacterium jensenii* P126. *Appl. Environ. Microbiol.*, 58(1): 215-220.
- Guzzo, J., Diorio, D.C., Alexander, D.C. and DuBow, M.S. (1999) Toward understanding metal stress in environment microbial flora. *Proceedings of the 8th International Symposium on Microbial Ecology*, Canada.
- Hancock, R.E.W. and Speert, D.P. (2000) Antibiotic Resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: Mechanisms and Impact on Treatment. *Drug Resist. Update.*, 3: 247-255.
- Hassen, A., Saidi, N., Cherif, M. and Boudabous, A. (1998a) Resistance of Environmental Bacteria to Heavy Metals. *Bioresource Technology.*, 64: 7-15.

- Hassen, A., Saidi, N., Cherif, M. and Boudabous, A. (1998b) Effects of Heavy Metals on *Pseudomonas aeruginosa* and *Bacillus thuringiensis*. **Bioresource Technology.**, 65: 73-82.
- Hirano, S.S. and Upper, C.D. (2000) Bacteria in the Leaf Ecosystem with Emphasis on *Pseudomonas syringae* a Pathogen, Ice Nucleus and Epiphyte. **Microbiol. Mol. Biol. R.**, 64(3): 624-653.
- Hoshino, T., Ishizaki, K., Sakamoto, T., Kumeta, H., Yumoto, I., Matsuyami, H. and Ohgiya, S. (1997) Isolation of a *Pseudomonas* Species from Fish Intestine that Produces a Protease Active at Low Temperature. **Letters in Applied Microbiology.**, 25: 70-72.
- Hu, M. Z.-C., Norman, J.M., Faison, B.D. and Reeves, M.E. (1996) Biosorption of uranium by *Pseudomonas aeruginosa* Strain CSU: Characterization and Comparison Studies. **Biotech. and Bioeng.**, 51: 237-47.
- Hussein, H., Ibrahim, S.F., Kandeel, K. and Moawad, H. (2004) Biosorption of Heavy Metals from Waste Water Using *Pseudomonas* sp. **Electronic Journal of Biotechnology.**, 7(1): 38-46.
- Isenberg, H. D., Alperstein, P. and France, K. (1999) In Vitro Activity of Ciprofloxacin, Levofloxacin, Trovafloxacin Alone and Combination with β -Lactams, Against Clinical Isolates of *Pseudomonas aeruginosa*, *Stenotrophomonas maltophilia* and *Bulholderia cepacia*. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, 33: 81-86.
- Ivanova, E. P., Sawabe, T., Alexeeva, Y. V., Lysenko, A. M., Gorshkova, N. M., Hayashi, K., Zukova, N. V. and Christen, R. (2000) *Pseudoalteromonas issachenkonii* KMM sp. nov., a Bacterium that Degrades the thallus of Brown alga *Fucus evanescens*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.**, 52: 229-232.
- Jensen, L.B., baloda, S., Boye, M. and Aarestrup, F.M. (2001) Antimicrobial Resistance Among *Pseudomonas* spp. and the *Bacillus cereus* Group Isolated from Danish Agricultural Soil. **Environ. Int.**, 26: 581-587.
- Kanner, D., Gerber, N.N. and Barth, R. (1978) Pattern of Phenazine Pigment Production by a Strain of *Pseudomonas aeruginosa*. **J. Bacteriol.**, 134(2): 690-692.
- Karlowsky, J. A., Kelly, L. J., Thornsberry, C., Jones, M. E., Evangelista, A. T., Critchley, I. A. and Sahm, D. F. (2002) Susceptibility to Fluoroquinolones Among Commonly Isolated Gram Negative Bacilli in 2000: Trust and TSN Data for the United States. **International Journal of Antimicrobial Agents.**, 19: 21-31.
- Kerry, E. (1993). Bioremediation of Experimental Petroleum Spills on Mineral Soils in the Vestfold Hills, Antarctica, **Polar Biol.**, 13: 163-170.
- Keskin, D. ve Ekmekçi, S. (2003) *Pseudomonas* türlerinin gıdalardan izolasyon ve tanımlanmasında kullanılan besiyerleri. **Mikrobiyoloji Dergisi.**, 1(8): 29-33.
- Kotsal, J., Sushanek, M., Klierova, H., Demnerova, K., Kralova, B. and McBeth, D.L. (1998) *Pseudomonas* C12B, an SDS Degrading Strain, Harbours a Plasmid Coding

- for Degradation of Medium Chain Length n-Alkanes. *Int. Biodeter. Biodegr.*, 42: 221-228.
- Krueger, T. S., Clark, E. A. and Nix, D. E. (2001) In Vitro susceptibility of *Stenotrophomonas maltophilia* to Various Antimicrobial Combinations. *Diagn. Microbiol. Infect Dis.*, 41: 71-78.
- Leborans, G. F. and Novillo, A. (1996) Toxicity and Bioaccumulation of Cadmium *Olithodiscus luteus* (Raphidophyceae). *Wat. Res.*, 30: 57-62.
- Lee, K., Park J.W. and Ahn, I.S. (2003) Effect of Additional Carbon Source on Naphthalene Biodegradation by *Pseudomonas putida* G7. *J. Hazard. Mater.*, B105, 157-167.
- Lehay, J.G and Colwell, R.R. (1990) Microbial degradation of hydrocarbons in the Environment. *Microbiol. Res.*, 54(3): 305-315.
- Li, X.Z., Nikaido, H. and Williams, K.E. (1997) Silver-Resistance Mutants of *Escherichia. coli* Display Active Efflux of Ag^+ and are Deficient in Porins. *J. Bacteriol.*, 179(19): 6127-6132.
- Li, G., Huang, W., Lerner, D.N. and Zhang, X. (2000) Enrichment of degrading microbes and bioremediation of petrochemical contaminants in polluted soil. *Wat. Res.*, 34(15): 3845-3853.
- Malik, A. and Jaiswal, R. (2000) Metal Resistance in *Pseudomonas* Strains Isolated from Soil Treated with Industrial Wastewater. *World J. Microb.Biot.*, 16: 177-182.
- McEldowney, S. (2000) The Impact of Surface Attachment on Cadmium Accumulation by *Pseudomonas fluorescens* H2. *FEMS Microbiology Ecology.*, 33: 121-128.
- Meyer, J.M. and Hohnadel, D. (1990) Pyoverdinin-Facilitated Iron Uptake in *Pseudomonas aeruginosa*: Immunological Characterization of the Ferripyoverdinin Receptor. *Mol. Microbiol.*, 4: 1401-1405.
- Miranda, C. D. and Zemelman, R. (2000) Antimicrobial Multiresistance in Bacteria Isolated from Fresh Water Chilean Salmon Farms. *The Science of the Total Environment.*, 293: 207-218.
- Mohan, S.V., Sistla, S., Guru, R.K., Prasad, K.K., Kumar, C.S, Ramakrishna, S.V, Sarma, P.N. (2003) Microbial Degradation of Pyridine Using *Pseudomonas* sp. and Isolation of Plasmid Responsible for Degradation. *Waste Manage.*, 23:167-171.
- NCCLS, National Committee for Clinical Laboratory Standards (1999) Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, 9th ed, Ninth *Informational Supplement M 100-s9*, Wayne Pa.
- Nies, D.H. and Silver, S. (1995) Ion Efflux Systems Involved in Bacterial Metal Resistance. *J. Ind. Microbiol.*, 14(2):186-199.
- Norberg, A.B. and Persson, H. (1984) Accumulation of Heavy Metal Ions by *Zoogloea ramigera*. *Biotech. and Bioeng.*, 26: 239-46.

- NTP. 2000. Toxicology and Carcinogenesis Studies of Naphthalene (CAS No: 91-20-3) in F344/NRats (Inhalation Studies). Technical Report Series No 500. Research Triangle Park, NC: National Toxicology Program.
- Pardo, R., Herguedas M., Barrado, E. and Vega, M. (2003) Biosorption of Cadmium, Copper, Lead and Zinc by Inactive Biomass of *Pseudomonas putida*. **Anal. Bioanal. Chem.**, 376:26-32.
- Pascucci, P.R. (1993) Simultaneous Multielement Study of the Binding of Metals in Solution by an Algal Biomass, *Chlorella vulgaris*. **Anal. Lett.**, 26: 445-55.
- Pascucci, P.R. and Sneddon J. (1993) A Simultaneous Multielement Flame Atomic Absorption Study for the Removal of Lead, Zinc and Copper by an Algal Biomass. **J. Environ. Sci. Health**, 28: 1483-93.
- Patterson, J.W. (1977) Waste Water Treatment. **Science Publishers**, USA.
- Reinheimer J.A., Demkow, M.R. and Candioti, M.C. (1990) Inhibition of coliform bacteria by lactic cultures. **Aust. J. Dairy Technol.**, May, 5-9.
- Richard, J.Y. and Vogel, T.M. (1999) Characterization of a Soil Bacterial Consortium Capable of Degrading Diesel Fuel. **Int. Biodeter. Biodegr.**, 44: 93-100.
- Richau, J. A., Choquenot, D., Fialho, A. M., Moreira, L. M. and Sa-Correia, I. (1997) The Biosynthesis of the Exopolysaccharide Gellan Result in the Decrease of *S. paucimobilis* Tolerance Copper. **Enzyme Microb. Technol.**, 2: 510-516.
- Sandrin, T.R. and Maler, R.M. (2003) Impact of Metals on the Biodegradation of Organik Pollutants. **Environment Health Perspectives.**, 111(8): 1093-1101.
- Sadhukhan, P.C., Ghosh, S., Chaudhuri, J., Ghosh, D.K. and Mandal, A. (1997) Mercury and Organomercurial Resistance in Bacteria Isolated from Freshwater Fish of Wetland Fisheries Around Calcutta. **Environ. Pollut.**, 97(1-2): 71-78.
- Sağ, Y., Açikel, Ü, Aksu, Z. and Kutsal, T. (1998) İkili Metal Karışımlarından Krom(VI), demir(III) ve Bakır(II) İyonlarının *R. arrhizus* ve *C. vulgaris*'e Yarışmalı Biyosorbsiyonu. **Tr. J. of Engineering and Environmental Sciences.**, 22: 145-154.
- Sag, Y. and Kutsal, T. (1995) Biosorption of Heavy Metals by *Zoogloea ramigera*: Use of Adsorption Isotherms and a Comparison of Biosorption Characteristics. **Chem. Eng. J. Bioch. Eng.**, 60: 181-8.
- Scott, J.A. and Palmer, S.J. (1988) Cadmium Bio-sorption by Bacterial Exopolysaccharide. **Biotechnology Letters.**, 10(1): 21-24.
- Shibl, A. M., Tawfic, A. F. and Ramadan, M. A. (1997) Comparative Efficacy of Successive exposure of *Pseudomonas aeruginosa* to Gentamicin and Ceftazidime., **International Journal of Antimicrobial Agents.**, 8: 257-261.
- Silver, S. (1992) Plasmid-Determined Metal Resistance Mechanisms: Range and Overview. **Plasmid.**, 27: 1-3.

- Silver, S. (1998) Genes for all Metals – A bacterial View of the Periodictable the 1996 Thom Award Lecture., **J. Ind. Microbiol. Biotech.**, 20:1-12.
- Silvia, J. (1996) Mechanisms of Antibiotic Resistance. **Current Therapeutic Research.**, 57: 30-34.
- Speciale, A., Musumeci, R., Blandino, G., Caccamo, F., Siracusa, V. and Renis, M. (2000) Molecular Mechanisms of resistance in *Pseudomonas aeruginosa* to Fluoroquinolones. **International Journal of Antimicrobial Agents.**, 14: 151-156.
- Tangaromsuk, J., Pakethitiyook, P., Kruatrachue, M. and Upatham, E. S. (2002) Cadmium Biosorption by *Sphingomonas paucimobilis* biomass. **Bioresource Technology.**, 85: 103-105.
- Tayeb, L. A., Ageron, E., Grimont, F. and Grimont, P. A. D. (2005) Molecular Pheylogeny of the Genus *Pseudomonas* Based on rpoB Sequences and Application for the Identification of Isolates. **Reaserch in Microbiology.**, 156: 763-773.
- Temiz, A. (2000) Genel Mikrobiyoloji Uygulama Teknikleri. **Hatiboğlu Yayınevi**, Ankara.
- Ting, Y. P., Lawson, F. and Prince, I. G. (1989) Uptake of Cadmium and Zinc by the Alga *Chlorella vulgaris*: Part 1. Individual Ion Species., **Biotech. and Bioeng.**, 34: 990-9.
- Ting, Y.P., Lawson, F. and Prince, I.G. (1991) Uptake of Cadmium and Zinc by the Alga *Chlorella vulgaris*: II. multi-ion situation. **Biotech. and Bioeng.**, 37: 445-55.
- Torres-Rubio, M.G., Valencia-Plata, S.A., Bernal-Castillo, J. and Martinez-Nieto, P. (2000) Isolation of Enterobacteria, *Azotobacter sp.* and *Pseudomonas sp.*, Producers of Indole-3-Acetic Acid and Siderophores, from Colombian Rice Rhizosphere. **Asociacion Latinoamericana de Microbiologia.**, 42: 171-176.
- Tsezos, M. and Volesky, B. (1981) Biosorption of Uranium and Thorium. **Biotech. and Bioeng.**, 23: 583-604.
- Uğur, A. ve Ceylan, Ö. (2003) *Pseudomonas* ve *Pseudomonas* İlişkili Bazı Genusların Fenetipik ve Moleküler Karakterizasyonu., **Muğla Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü**, Muğla, 133s.
- Vachee, A., Mossel, D.A.A. and Leclerc, H. (1997) Antimicrobial Activity Among *Pseudomonas* and Related Strains of Mineral Water Origin. **J. Appl. Microbiol.**, 83: 652-658.
- Vieira, R.H.S. and Volesky, B. (2000) Biosorption : A solution to Pollution. **Int. Microbiol.**, 3:17-24.
- Wang, L. and Jayarao, B.M. (2001) Phenotypic and Genotypic Characterization of *Pseudomonas fluorescens* Isolated from Bulk Tank Milk. **American Dairy Science Association.**, 84: 1421-1429.

- Wehrheim, B. and Wetter, M. (1994) Biosorption of Cadmium, Copper and Lead by Isolated Mother Cell Walls and Whole Cells of *Chlorella fusca*. ***Appl. Microbiol. Biotechnol.***, 41: 425-28.
- Whyte, L.Y., Bourbonniere, L. and Greer, C.W. (1997) Biodegradation of Petroleum Hydrocarbons by Psychrotrophic *Pseudomonas* Strains Possessing Alkane (alk) and Naphthalene (nah) Catabolic Pathways. ***Appl. Environ. Microbiol.***, 63(9): 3719-3723.
- Wiedmann, M., Weilmeier, D., Dinen, S.S., Ralyea, R. and Borr, K.J. (2000) Molecular and Phenotypic Characterization of *Pseudomonas* ssp. Isolated from Milk. ***Appl. Environ. Microbiol.***, 66(5): 2085-2095.
- Wilde, E.W. and Benemann, J.R. (1993) Bioremoval of Heavy Metals by the Use of Microalgae. ***Biotech. Adv.***, 11: 781-812.
- Yoo, J. Y., Choi, J., Lee, T. and Park, J. W. (2004) Organobentonite for Sorption and Degradation of Phenol in the Presence of Heavy Metals, ***Water Air Soil Poll.***, 154 (1-4): 225-237.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı Soyadı : Sibel GÜLCAN
Doğum Tarihi : 1980
Doğum Yeri : Ankara

Eğitim

Ortaöğrenim : 1994-1997 : Gülveren Lisesi (Ankara)

Lisans : 1998-2003 : Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü (1 yıl İngilizce hazırlık)

Yüksek Lisans: 2003- : Pamukkale Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü

İşyeri Bilgileri

2003- Araştırma Görevlisi, Pamukkale Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı