

ÖZET

BAZI PSEUDOMONAS CİNSİ BAKTERİLERİN PROTEOLİTİK VE LİPOLİTİK AKTİVİTELERİNİN BELİRLENMESİ

ÇAYLAK, Tuba
Niğde Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman : Doç. Dr. Gökçen YUVALI ÇELİK

Ocak 2010, 39 sayfa

Araştırmada *Pseudomonas fluorescens* ssp. *indologenes*, *Pseudomonas vesicularis*, *Pseudomonas luteola*, *Pseudomonas aeruginosa* türlerine ait toplam 15 adet suş kullanılmıştır. Suşlar çiğ süt örneklerinden izole edilmiş ve Analitik Profil İndeksin kullanımı (API 20NE) ile tanımlanmışlardır. *Pseudomonas* spp. suşlarının amfisilin (10 µg), amikasin (30 µg), gentamisin (10 µg), oflaksasin (5 µg), tetrasiklin (30 µg), kloramfenikol (30 µg), sefuroksin (30 µg) antibiyotiklerine karşı duyarlılık testleri disk difüzyon yöntemine göre yapılmış, sonuçlar NCCLS kriterlerine göre değerlendirilmiştir. *Pseudomonas* spp. suşlarının kullanılan 7 adet antibiyotiğe karşı ortalama olarak %57'sinin duyarlı, %35'inin dirençli ve %7'sinin orta duyarlı olduğu tespit edilmiştir.

Pseudomonas spp. suşlarının Skim Milk Agar (SMA) besi ortamında proteolitik aktiviteleri incelenmiş ve 14 adet suşun proteolitik aktiviteye sahip oldukları belirlenmiştir. Bu suşlarda tespit edilen proteolitik aktivite, 8,0-55,0 mm zon çapı arasında, ortalama olarak 28,1 mm hesaplanmıştır. En yüksek proteolitik aktivite zon çapı, 55,0 mm ile *P. fluorescens* ssp. *indologenes* T₇'de bulunmuştur.

Çalışmada, *Pseudomonas* spp. suşlarının Tribütirin Agar (TA) besi ortamında lipolitik aktiviteleri incelenmiştir. Toplam 13 adet suşun lipolitik aktiviteye sahip oldukları belirlenmiştir. Bu suşlarda tespit edilen lipolitik aktivite 5,3-29,3 mm zon çapı arasında bulunmuş, ortalama olarak 15,4 mm hesaplanmıştır. En yüksek lipolitik aktivite zon çapı, 29,3 mm ile *P. fluorescens* ssp. *indologenes* T₈'de bulunmuştur.

ABSTRACT

DETERMINATION OF PROTEOLYTIC AND LIPOLYTIC ACTIVITIES OF SOME PSEUDOMONAS BACTERIA

ÇAYLAK, Tuba

Nigde University

Science Institute

Biology Department

Supervisor : Assoc. Prof. Dr. Gökçen YUVALI ÇELİK

January 2010, 39 pages

In the study, a total of fifteen strains belonging to *Pseudomonas fluorescens* ssp. *indologenes*, *Pseudomonas vesicularis*, *Pseudomonas luteola*, *Pseudomonas aeruginosa* were analysed. Strains were isolated from the raw milk and identified by using Analytical Profile Indeks (API 20 NE). Antibiotic susceptibility tests of *Pseudomonas* spp. strains to ampicillin (10 µg), amikacine (30 µg), gentamicine (10 µg), ofloxacin (5 µg), tetracycline (30 µg), chloramphenicol (30 µg), cephuroxime (30 µg) were determined by using the disk diffusion method. The results were described according to NCCLS standards. It was determined that 57% of *Pseudomonas* strains were susceptible, 35% were resistant and 7% were intermediate susceptibility against fifteen antibiotics tested.

Proteolytic activities of *Pseudomonas* isolates were tested in Skim Milk Agar (SMA) medium and fourteen strains were determined that had a proteolytic activities. Proteolytic activities of these strains were found between 8.0-55.0 mm with an average 28.1 mm zone diameter. The highest proteolytic activity 55.0 mm was found in *P. fluorescens* ssp. *indologenes* T₇ strain.

In this study, lipolytic activities of *Pseudomonas* isolates were tested in Tributirin Agar (TA) medium. Thirteen strains were determined that had a lipolytic activities. Lipolytic activities of these strains were found between 5.3-29.3 with an average 15.4 mm zone diameter. The highest zone diameter of lipolytic activity 29.3 mm was found in *P. fluorescens* ssp. *indologenes* T₈ strain.

BÖLÜM I

GİRİŞ

Gıdaların birçok hastalığın kaynağını oluşturduğu ve yayılmasında önemli bir rol oynadığı bilinmektedir. Gıda kaynaklı hastalıklar; mikrobiyal, kimyasal, bitkisel veya hayvansal etkenlere bağlı olabilmektedirler. Gıda kaynaklı hastalıklar, enfeksiyon veya toksikasyon şeklinde ortaya çıkmaktadır. Mikroorganizmaların salgıladıkları toksinler, toksikasyon tipi hastalıklarda, hastalık etkenini oluştururken; gıda enfeksiyonlarının etkeni enterotoksijenik veya invazif mikroorganizmalardır [1].

Çiğ sütlerde Gram negatif psikrofil flora üzerine yapılan araştırmalarda *Pseudomonas*'ların en sık bulunduğu saptanmıştır. Soğukta bekletilen sütlerde, *Pseudomonas* grubu bakterilerin salgıladıkları proteaz ve lipaz gibi ekstraselüler enzimlerin varlığı, bu enzimlerin ısıya son derece dirençli olmaları ve aktivitelerinin UHT (Ultra High Temperature) işlemine bile dayanabilmeleri ürün bazında sorunlar yaratmaktadır. Isıl işlem sonrası süt içerisindeki mikroorganizmaların büyük bir çoğunluğu canlılıklarını kaybetmekte ancak bu enzimler aktivitelerini sürdürebilmektedirler. Lipaz enzim aktivitesi sonucunda gliserin ve yağ asitleri açığa çıkmakta, doymamış yağ asitlerinin oksidasyonu diğer reaksiyonlarla birlikte aldehit, keton ve asit bileşiklerinin oluşmasına neden olmakta ve sonuçta acı tat ve kötü koku oluşmaktadır. Proteaz enzim aktivitesi nedeniyle ise UHT sütte asitlik gelişmeksizin tatlı pıhtılaşma denilen enzimatik bir hata oluşmakta, proteinler parçalanmakta ve kabın dibinde pıhtı oluşmaktadır [2,3].

BÖLÜM II

ÇİĞ SÜT ve MİKROBİYOLOJİK FLORASI

Süt beslenmede büyük öneme sahip olan temel besin maddesi olmasına rağmen birçok mikroorganizmanın üremesi için de kompleks son derece uygun mükemmel bir ortam oluşturmaktadır. Sağlıklı bir hayvandan aseptik koşullarda sağılan taze süt çok az sayıda bakteri içerir. Süt memede bulunduğu dönemde sterildir, ancak sağım sırasında ve sağımdan sonra çeşitli aşamalarda süte mikroorganizmalar bulaşabilir [2]. En önemli bulaşma kaynakları hayvanın memesi, deri, kıl, insan eli, sağım makineleri, süt kapları ve soğutuculardır. Süte bu çevrelerden genellikle hava, toz, toprak, su ve gübre kaynaklı mikroorganizmalar bulaşır. Bunun yanında süttten yapılan çeşitli süt mamulleri, süte daha önceden bulaşan mikroorganizmalara ilave olarak üretim sırasında insan eli, su, alet ve ekipman, katkı maddeleri ve paketlenme materyalinden gelen mikroorganizmalarla bulaşır [2].

Son yıllarda yapılan çalışmalarda süttün memede bulunduğu dönemde bile az sayıda ve insanda hastalık yapmayan mikroorganizma içerdiği anlaşılmıştır. Çiğ süttün başlangıçtaki içerdiği mikrobiyolojik florası ne olursa olsun meme kanalı, meme başları ve meme lobunun dış yüzeyi, sağım aletleri, süttü tüketiciye ulaştırana kadar geçen bekletme koşullarında mikroorganizmalar ile kontamine olabilir [2].

Süttün kalitesi büyük oranda içerdiği mikroorganizma sayısına bağlıdır. Bazı bakteriler ve mayalar süt ürünlerinin üretiminde kullanılırken, diğerleri ise bozulmaya neden olur. Süttün bozulmasına en çok *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Microbacterium*, *Achromobacter*, *Pseudomonas*, *Flavobacterium* ve *Bacillus* türleri neden olmaktadır. Bunlar içindede taze çiğ süt florasının %50'sini oluşturan *Pseudomonas*'lar (*P.fluorescens*, *P.fragi* ve *P.aeruginosa*) ve bunların ısıya dayanıklı lipaz ve proteinaz enzimlerinin rolü önemlidir [4].

İnsan beslenmesinde çok önemli bir yere sahip olan süt, hijyenik koşullarda üretilmediği, saklanmadığı, işlenmediği gerekli kontrollerin yapılmadığı durumlarda insan sağlığı açısından zararlı olabilmektedir. Çiğ süt az sayıda bakteri içerse bile sağımdan sonra çevreden çeşitli yollarla bulaşan mikroorganizmaların etkisiyle oldukça kısa sürede bozulur ve insanlarda hastalıklara yol açan birçok patojenin potansiyel

kaynağını oluşturur. Bu nedenle çiğ süt, insan gıdası olarak doğrudan tüketime uygun değildir [5].

Çiftliklerde sütlerin uzun süre soğukta depolanmasının nedeni, mezofilik mikro floranın gelişmesi ile ilgili problemleri en aza indirmektir. Bununla beraber, çiğ sütün düşük sıcaklıkta depolanması nedeniyle psikrofilik bakterilerin neden olduğu yeni problemler ortaya çıkmaktadır [5].

Türkiye'nin kırsal yapısına bakıldığında sütün çiftliklerden ziyade köylülerden toplandığı görülmektedir. Bu aşamada enzimlerin varlığı değil, ancak bu enzimleri üreten bakteri varlığının doğru şekilde belirlenmesi, bölgelere göre hangi sütün UHT'ye verilmesi kararında önemlidir. Bu belirleme sonunda bölgeye yönelik gerekli eğitim ve düzeltici-önleyici faaliyet ile UHT sütlerdeki raf ömrü uzatılacaktır. Bu nedenlerle *Pseudomonas*'ların gıdalardan izolasyonu ve sayımı önem kazanmaktadır. *P. aeruginosa*'nın çeşitli gıda örneklerinde sayımı için Glutamate Starch Phenol Red Agar (GSP) ve Setrimide Agar besiyerleri önerilmekle beraber, sanayiden gelen veriler bu besiyerlerinin selektivitesinin *Pseudomonas*'lar için yeterli olmadığı yönündedir [2].

*Pseudomonas*lar doğada toprak ve suda yaygın olarak bulunan aynı zamanda hayvan derisi üzerinde sıkça rastlanan bakteriler olduğundan dolayı sütün sağımı sırasında hijyenik koşullara dikkat edilmediği takdirde süte bulaşabilmektedirler. *Pseudomonas*'lar özellikle süt ekipmanları ve hortum başlarında kolonizasyon yapabilmektedirler [2].

BÖLÜM III

GENEL BİLGİLER, PSEUDOMONAS CİNSİ BAKTERİLER VE GENEL ÖZELLİKLERİ

3.1. Tarihçesi

Pseudomonas, Yunanca sahte birim demektir. Sahte manasına gelen “pseudo” ve birim manasına gelen “monas” kelimelerinden türetilmiştir. Mikrobiyolojinin ilk yıllarında bu isim bütün mikroorganizmaları tanımlamak için kullanılıyordu. *Aeruginosa* ise Latince bakır parası manasına gelmektedir [6].

P. aeruginosa, 1850’de Sedillot tarafından cerrahi yara pansumanlarında mavi renk değişikliği yapan bir ajan olarak tanımlanmıştır. İlk olarak *Bacillus pyocyaneus* ve daha sonra *Pseudomonas pyocyanea* olarak adlandırılmıştır. Piyosiyanin izolasyonu Lucke tarafından 1862’de yapılmıştır. Gram-negatif ve zorunlu aerop olan *Pseudomonas*’lar ilk kez Gessard tarafından 1882’de tanımlanmıştır ve bu organizmalar Gessard’ın klasik çalışmaları ile saf kültür halinde izole edilmiştir. 1897’de Hitschman ve Kreibich, 1917’de Frenkel ve 1925’de Osler patojen bir bakteri olduğunu tanımlamışlardır. 1926 yılında California Üniversitesindeki Dooren de Jong, *Pseudomonas* türlerini, çeşitli organik bileşiklerin karbon ve enerji kaynağı olarak kullanımına dayanan fenotipik özelliklerine göre sınıflandırmışlardır. 1966’da Buchanon, Holt ve Lessel *Pseudomonas* türlerini fenotipik özelliklerine göre sınıflandırmışlardır. Daha sonra DNA hibridizasyon çalışmaları başlamıştır. 1973 yılında Palleroni ve arkadaşları, nükleik asit hibridizasyon çalışmalarını genişleterek *Pseudomonas*’ları rRNA homojenlerine göre beş guruba ayırmışlardır. Son yıllarda yapılan çalışmalarda bu cinsin sınıflandırılması yeniden düzenlenmiştir [7].

3.2. *Pseudomonas* cinsi bakterilerin genel özellikleri

Pseudomonadaceae familyasına bağlı *Pseudomonas* cinsi bakteriler gram negatif çubuklardır. Bu bakterilerin çoğu doğada toprak ve sularda yoğun olarak bulunur. Bazı türleri insan, hayvan ve bitki patojenidir. Son derece önemli olan bu cinsin türlerinin bazıları oksidaz pozitif, bazıları oksidaz negatiftir tamamı ise katalaz pozitifdir. Glikozu oksidasyon yoluyla parçalayan bakterilerdir. Aerobik solunum yaparlar bazı durumlarda son elektron alıcısı olarak nitrati kullanabilirler. Hareketli bir veya daha fazla polar

flagellaya sahiptirler. *Pseudomonas*'ları gıdalar için önemli kılan pek çok özellik vardır. Bazı türleri proteolitik ve lipolitik aktivite göstermektedir. Aerobik olmaları nedeniyle gıdaların yüzeyinde hızla gelişirler ve sonuçta okside ürünler ve mukoz madde oluştururlar. Kendi gelişmeleri için gerekli olan gelişme faktörlerini ve vitaminleri sentezleme yeteneğindedirler. Psikrofil, mezofil ve psikrotrof türleri vardır. Özellikle soğukta saklanan süt, et, yumurta ve deniz ürünlerinin birinci derecede bozulma etmenidirler. Isı ve radyasyonla kolaylıkla inhibe olabilmektedirler. Oksijensiz koşullarda ve 42 °C' nin üzerinde çoğalamazlar. Kurumaya dirençlilikleri zayıftır [8,9,10].

Bu cinsin üyeleri, birçok antibiyotiğe dirençli olduklarından ve ancak birkaç bakterinin tolere edebildiği koşullarda canlılıklarını sürdürebilmeleri nedeni ile klinik açıdan da oldukça önemlidirler [11].

Pseudomonas suşlarının çoğu kültür ortamında pigment üretirler. Pigment oluşumu kültür koşullarına bağlıdır. Mutasyonla bu özellik kaybolur ya da aynı anda birçok pigment oluşumu görülebilir. Bu pigmentler oksijensiz ortamda oluşmazlar, oda sıcaklığında daha iyi oluşurlar [12,13].

Fluoresan pigmentler, fluoresans özellik taşıyan *Pseudomonas* 'ların (*P. aeruginosa*, *P. putida*, *P. fluorescens*, *P. chlororaphis*, *P. syringae*, *P. cichori*, *P. flavescens*) karakteristiğidir. Bu pigmentler sideroforlardır ve kültür ortamında düşük demir konsantrasyonlarında bol miktarda üretilirler. King B kültür ortamı, fluoresan pigmentlerin üretimini uyarmakta kullanılır. Fluoressein, kloroformda çözünmeyen ancak suda çözünen sarımsı renkte bir fluoresan pigmentidir. Bu pigmentin görülebilmesi için bazen UV ışığa ihtiyaç duyulur. King B besiyerinde klinik izolatların %70'i bu pigmenti oluşturur. Fluoresan bir pigment olan piyoverdin, referans bir *Pseudomonas* suşundan (PAO1) izole edilmiştir [14,15].

Piyosiyenin, mavi bir fenazin türevidir. *P. aeruginosa* için karakteristiktir. Asidifikasyonla rengi önce sarıya sonra da kırmızıya dönebilir, alkali ortamlarda ise renksizleşebilir. Suda ve kloroformda erir. Sıvı besiyerlerinden yapılmış bakteri kültürlerine eşit miktarda kloroform eklenir ve çalkalanırsa bu pigment besiyerinin içinde çökmüş halde bulunan kloroform içerisinde kristalize olarak koyu mavi renkte gözlenir. Piyosiyenin üretimi King A besiyeri kullanılarak artırılabilir. 37 °C'de 5 gün

inkübe edilen *P. aeruginosa* suşlarının %80'i piyosiyonin oluşturur. Oda sıcaklığında 3-4 gün bırakılarak agar kültürlerinde pigmentasyonda artış gözlenir [2,14,15].

Birçok *Pseudomonas* türü amonyum tuzlarının ve tek bir karbon kaynağının bulunduğu ortamlarda gelişebilirler. Sadece birkaç tür organik gelişim faktörlerine ihtiyaç duyar. Kemoorganotrofiklerdir, fakat bazı türleri ototrofik şartlar altında da gelişebilir. Hiç bir türü fermentatif ve fotosentetik değildir [16].

Pseudomonas' ların son elektron alıcıları genellikle oksijendir ancak bazı türlerde alıcısı nitrat da olabilir. *Pseudomonas* türleri Entner-Doudoroff izyolunu kullanırlar fakat glikoz oksidasyonunun alternatif izyollarını da kullanabilirler. Nitrat asimilasyonu amonyağın redüksiyonu yolu ile aerobik olarak gerçekleştirilir [17].

Bir çok aromatik bileşikler *Pseudomonas* türleri tarafından metabolize edilebilir. Buna bağlı olarak petrol ve türevlerinin biyoremediasyonunda kullanılırlar. Bu bakteriler tüm aminoasitleri karbon, azot ve enerji kaynağı olarak kullanabilirler. Sadece metionin yalnız azot kaynağı olarak kullanılır [16].

Pseudomonas bakterileri genetik çalışmalarda özel bir ilgiye sahiptir. Bunun nedenleri, geniş bir yayılım alanına, medikal öneme, beslenme ve biyokimyasal çok yönlülüğüne sahip olmaları ile laboratuvar ortamlarında geliştirilebilmeleri için gerekli şartların basit olmasıdır [17].

Genetik araştırmalar yönünden *P. aeruginosa* PAO1 suşu oldukça detaylı çalışılmıştır ve bu suşun genom dizisi belirlenmiştir. Bakterinin genom büyüklüğünün 6 264 403 bp olduğu belirlenmiştir [18].

P. aeruginosa'nın proteolitik enzim, letal ekzotoksin ve enterotoksin özellikli hücre dışı salgılarının olması ve fırsatçı patojen özelliğinin bulunmasından dolayı çeşitli hastalıkların oluşmasına sebep olurlar. *Pseudomonas*'lar idrar yolu, göz, dış kulak, orta kulak, yanık, yara, enfeksiyonları, menenjit, bronşit ve bronkpnömoni, septisemi, osteomyelit, pseudomembranöz, kolit gibi hastalıklardan izole edilebilir [19].

P. aeruginosa insanda yaygın olarak bulunan saprofit bir bakteri olmasına rağmen sağlıklı insanlarda nadiren enfeksiyonlara neden olurlar. Bu mikroorganizmanın sebep olduğu hastalıklar çeşitli sebeplerle (yanık hastaları, vücudunun çeşitli bölgelerinde

kateter bulunduran hastalar, yeni doğanlar, AIDS hastaları, kistik fibrozis hastaları, notropeni hastaları ve vücut bütünlüğü bozulmuş hastalarda görülür [20].

Pseudomonas'ların türleri oldukça fazla olduğu için görünümlerine, pigment oluşturup oluşturmamalarına ve metabolizmalarına göre sınıflandırmaları yapılmıştır. RNA/DNA hibridizasyon deneylerine göre, bu iki nükleik asidin gösterdiği uyumlara bakarak, bu bakteriler I, II, III, IV, V rRNA gruplarına ayrılmışlardır [21].

Özellikle süt, tavuk, balık, et ve sebzenin bozulmasından sorumludurlar Gıdaların bozulmasıyla ilgili *Pseudomonas* türleri şunlardır; *P.ambigua*, *P.coharens*, *P.convexa*, *P.fluorescens*, *P.fragi*, *P.incognata*, *P.ovalis* *P. fluorescens*, *P.fragi*, *P.incognata*, *P.ovalis*, *P.perolens* ve *P.putrefaciens*'dir [22].

Pseudomonas'lar lipolitik ve proteolitik aktiviteleri sonucunda gıdalarda istenmeyen tat, renk ve koku oluştururlar. Taze etlerde ve diğer gıdalarda kalite kriterlerini belirlemede *Pseudomonas*'ların izolasyonu ve sayımı önemlidir [23].

3.3. *Pseudomonas*'ların antibiyotik duyarlılığı

Antibiyotikler, özellikle topraktaki mikroorganizmalar tarafından diğer mikroorganizmaları öldürmek veya üremelerini durdurmak için üretilen maddeler olup, mikrobik hücre metabolizmasının ürünleridir. Mikroorganizmaların çoğu kendi oluşturduğu antibiyotiklere dirençlidir, ancak diğer antibiyotiklerden etkilenirler ve kendi antibiyotikleri yakın ilişkili türlere etkili olabilir [24].

Kemoterapötik olarak adlandırılan kimyasal maddelerin infeksiyon hastalıklarının tedavisinde kullanılması 17.yy. itibaren başlamıştır. Bu tür tedavilerin bilimsel bir temele oturması, bu yüzyılın başında Paul Ehrlich seçici toksik etki kavramını ortaya atması ile olmuştur. Antimikrobiyal tedavi 1935 yılında Domogk'un sülfamitleri tedavide kullanmasıyla gelişme safhasına girmiştir. 1929'da Fleming 'in gözlemlendiği ve 1940 da Chain ve Flarey'in *Penicillium notatumdan* elde ettiği bir maddenin mikroorganizmalar üzerine öldürücü etkisi ile antibiyotikler tedavide kullanılmaya başlamıştır [25].

Mikroorganizmalar, biyosferde rüzgar ve su ile kolayca taşınabilmekte ve ekosistemler (insan ve hayvanlardan toprak ve suya) arasında yer değiştirebilmektedirler. Böylece

direnç genleri bir ekosistemdeki organizmalar tarafından farklı ekosistemlerdeki organizmalara kolaylıkla transfer edilebilmektedirler. Buna ilaveten canlı organizmaların geniş çaptaki hareketliliği mikroorganizmalar ve genlerinin yayılmasını kolaylaştırmaktadır [26].

Bakterilerde antibiyotik direncinin kaynağı genetiğe bağlı olan veya genetiğe bağlı olmayan olmak üzere 2 ye ayrılır. Direncin önlenmesi için ilaçlar yeterli doz ve sürede tercihen geniş spektrumlu olarak kullanılmalı, antibiyogram testi yapılmalı, sinerjistik etkiyi arttırmak için kombinasyonları kullanılmalı, hayvan yemlerine ve gıdalara koruyucu amaçlı antibiyotik konulmamalıdır [25].

Çoğu *Pseudomonas* 'lar birçok antimikrobiyal ajana karşı dirençlidir. Antibiyotik ve ilaçlar, pratik öneme sahiptir ve genellikle yeni türlerin tanınmasına yardımcı olurlar. Bununla beraber, *P. aeruginosa* üzerindeki araştırmalar, cinsin diğer türleri üzerindikilerden çok daha detaylıdır (Sneath, 1986). Birçok antibiyotik in vitro alanda *P.aeruginosa*'nın gelişimini inhibe etmektedir. Karbenisilin, tikarsilin, piperasilin (penisilinler); sefoperazon, seftazidim, sefepim, sefpirom (sefalosporin); monobaktam aztreonam; imipenem ve meropenem (karbapenemler) gibi bazı β -laktam antibiyotikler; gentamisin, tobramisin ve amikasin gibi aminoglikositler bir çok suşa karşı aktiftir (Collier et al., 1998). Karbenisiline dirençlilik genleri plazmid tarafından kodlanan β -laktamazdan dolayı olabilir. β -laktamazın 7 farklı çeşidi en az 8 farklı gruba ait *Pseudomonas* plazmidinde bulunmuştur [27].

Pseudomonas aeruginosa genetik olarak birçok antibiyotiğe doğal olarak dirençli olmasının yanı sıra kemoterapi sırasında da çoğul dirençli suşlar ortaya çıkabilmektedir [23].

Bu direnç mekanizmaları başlıca şu şekildedir:

- Beta laktamaz salınmasına bağlı direnç; Kromozomal ve plazmid kaynaklı beta laktamazların üretimi.
- Antibiyotik hedeflerinde değişiklik sonucu oluşan direnç; Penisilin bağlayan proteinler (PBP)'deki değişime bağlı olan bu direnç Gram negatif bakterilerde yaygın değildir. Bununla birlikte *pseudomonas* cinsi bakterilerde beta-laktamaz üretmeyen suşlardaki penisilin direncine düşük afiniteli PBP'ler neden olur .

- Dış membran geçirgenliğinin azalması ile kazanılan direnç; Porin proteinlerinde değişiklik.
- Aktif dış pompalama sistemi ile antibiyotiğin dışarı atılmasına bağlı direnç.

3.4. *Pseudomonas*' lar tarafından üretilen ekstraselüler enzimler

Hücrelerde oldukça önemli metabolik görevleri olan enzimler, biyokimyasal reaksiyonları katalize eden protein yapısında moleküllerdir ve çeşitli amaçlarla kullanılmak üzere gündelik ve ekonomik hayata girmiştir. Endüstrinin hemen her alanında kullanılan enzimler genellikle mikroorganizmalardan elde edilmektedir. Çünkü mikroorganizma kaynaklı enzimlerin bitkisel veya hayvansal kaynaklı enzimlere göre katalitik aktivitelerinin çok yüksek olmaları, istenmeyen yan ürün oluşturmamaları, daha stabil ve ucuz olmaları, fazla miktarda elde edilebilmeleri gibi avantajları vardır. Bu mikroorganizmalar yalnızca enzim üretme yeteneklerine göre değil, mikroorganizmaların toksik ve patojen olmamasına göre de seçilmiştir. Bugün endüstride kullanılan birçok enzim mikrobiyal kökenli olduğu için, endüstriyel enzimlerin kullanımında, mikroorganizma kullanımı artmıştır [26]. Bu enzimlerden mikrobiyal proteazlar ve lipazlar et, süt ve süt ürünlerinde bozulmaya neden olma özelliklerinden dolayı büyük öneme sahiptirler [28,29].

3.4.1. Proteazlar

Proteazlar, doğada bitkisel, hayvansal ve mikrobiyal kalıntıların dekompozisyonunda önemli rol oynamaktadırlar ve böylece besin döngüsünü sağlamakta ve ayrıca bitkilerin besinleri alabilmelerini sağlamaktadır. Proteazlar, toplam endüstriyel enzim ticaretinin yaklaşık % 60'ını oluşturmaktadır. Proteazlar, çamaşır deterjanları, deri, et, süt, ilaç, bira, fotoğraf, organik sentezlerde ve atıkların muamelesinde kullanılmaktadır. Proteazlar arasında bakteriyel proteazlar, hayvan ve fungal proteazlar ile karşılaştırıldığı zaman daha etkin olduğu görülmektedir [30].

Proteaz enzimine sahip olan mikroorganizmalar gıdalar üzerinde gelişerek proteinleri hidrolize ederler. Bunun sonucunda da gıdanın tat ve koku bileşenleri üzerinde olumsuz etkilere neden olurlar. Özellikle depolama süresi boyunca bu mikroorganizmalar çoğalmakta ve bazen gıdayı tüketilemeyecek hale getirmektedir. Proteolitik mikroorganizma türleri *Pseudomonas*, *Clostridium*, *Bacillus* ve *Proteus* cinsleri içinde

yer almaktadır. Bu bakterilerin haricinde bazı maya ve küf türleride proteolitik aktivite gösterebilmektedir [27].

Sütte bulunan birçok *Pseudomonas* türü tarafından üretilen proteazlar hem UHT hem de pastörizasyon işlemlerine dayanıklıdır [28,29]. *Pseudomonas* spp. özellikle de *Pseudomonas fluorescens* süttten izole edilen ve proteolitik aktivite gösteren psikrotrof bakteriler arasında en yaygın olanıdır [23].

3.4.2. Lipazlar

Süt ve süt ürünlerinde *Pseudomonas*'lar tarafından meydana gelen ikinci önemli yapısal değişiklik lipolizdir. Lipazlar suda çözünmeyen trigliseritleri, di ve mono- gliseridlere, serbest yağ asitlerine ve gliserole hidrolizini katalizleyen enzimlerdir. Çiğ sütlerden izole edilen lipolitik bakterilerin idenfikasyonu ile ilgili yapılan çalışmalarda bu enzimin en yüksek aktivitesinin *Pseudomonas* türlerinde olduğu belirlenmiştir [2].

Lipaz üreten mikroorganizmalar doğada çok geniş bir alana yayılmıştır. Lipolitik aktivite gösteren bakteri türleri *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Moraxella* ve *Staphylococcus*, küf türleri *Rhizopus*, *Geotrichum*, *Aspergillus*, *Mucor* ve *Penicillium* ve maya türleri ise *Candida*, *Rhodotorula* ve *Hansenula* cinsleri içinde yer almaktadır [27].

Bakteriyel lipazlar arasında özellikle *Pseudomonas* cinsine ait lipazlar, biyoteknolojik açıdan özel bir ilgiye sahiptir olup, endüstriyel uygulamalarda ve organik sentezinde önemli bir rol oynamaktadır [31].

Lipazlar, hem sulu hem de susuz solvent sistemlerinde aktivite gösterdikleri için endüstride ve tıp alanında önemli bir yere sahiptirler. Bu enzimlerin lipid içeren atık suların enzimatik degradasyonu, organik sentez, deterjan formülasyonu, biyosümfektanların sentezi, oleokimyasal endüstri, süt endüstrisi, agrokimyasal endüstri, kağıt yapımı, besin, kozmetik, kimyasal analiz ve ilaç prosesinde umut verici uygulama alanları bulunmaktadır. Lipaz teknolojisindeki gelişmelerle birlikte yeni bileşiklerin sentezi için de bu enzimlerin kullanımları hızla artmaktadır. Mikrobiyal lipazların, biyosensör olarak kullanılmaları ise yeni bir alan olarak ümit vaat etmektedir [32].

BÖLÜM IV

MATERYAL METOD

4.1. Materyal

4.1.1. Materyal örnekleri

03.01.2008 - 25.05.2009 tarihleri arasında çiğ süt örnekleri ile çalışılmış olup örneklerin bir kısmı Kayseri ilinden ve bir kısmı Niğde ilindeki çeşitli köy ve kasabalardan (Sazala, Hüsniye, Çamardı) ve sokak sütçülerinden sağlanan süt örnekleridir. Toplanan çiğ süt örneklerinden 15 adet *Pseudomonas* cinsi bakterilerine ait suşların temin ve izole edildiği kaynaklar ve kodları Çizelge 4.1’ de verilmiştir. Çalışmada kullanılan malzemeler ve cihazlar için Niğde Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Mikrobiyoloji Araştırma Laboratuvarından yararlanılmıştır.

Çizelge 4.1. *Pseudomonas* cinsi bakterilere ait suşların temin ve izole edildiği kaynaklar

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

4.1.2. Araştırmada kullanılan besiyerleri

Bakterilerin izolasyon alışmalarında Pseudomonas Selective CN, CFC Agar Base (Merck 1.07620), McConkey Agar (Merck) ve Cetrimide Agar besiyortamları kullanılmıştır [33].

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

Setrimit Agar Besiyortamı

Maddeler	g/L
Agar	13,6
K ₂ SO ₄	10,0
MgCl ₂	1,4
Setrimit	0,3
Gliserol	10,0

Maddeler bir litre distile suya ilave edilmiştir. Besiyortamının pH'sı 0,01 N HCl ve 0,01 N NaOH'le 7,2±0,2'ye ayarlanmıştır. Besiyortamı 121°C'de 15 dakika otoklavda steril edilmiştir.

Pseudomonas F (King B) Besi ortamı

Maddeler	g/L
Proteose peptone	20,0
KH ₂ PO ₄	1,5
MgSO ₄	1,5
Gliserol	10,0

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

Araştırmada kullanılan bakterilerin proteolitik aktivite incelenmesi çalışmasında Skim Milk Agar (SMA) besiortamı kullanılmıştır. Lipolitik aktivite çalışması ise Tribütirin Agar (TA) (Merck 1.01957) besiortamından yararlanılarak gerçekleştirilmiştir [29].

Skim Milk Agar (SMA) Besiortamı

Maddeler	g/L
Skim Milk (Oxoid)	100,0
Nutrient Agar (Difco)	28,0

Maddeler bir litre distile su içerisine ilave edilmiştir. Besiortamı 121°C'de 15 dakika otoklavda sterilize edilmiştir.

Antibiyotik duyarlılığı çalışmasında disk difüzyon yönteminde Mueller- Hinton Agar (Lamb) besiyeri kullanılmıştır.

4.1.3. Araştırmada kullanılan antibiyotik diskleri

Pseudomonas spp. suşlarının amfisilin (10 µg), amikasin (30 µg), gentamisin (10 µg), oflaksasin (5 µg), tetrasiklin (30 µg), kloramfenikol (30 µg), sefuroksin (30 µg), antibiyotiklerine duyarlılıkları test edilmiştir.

4.2. Metod

Araştırmada Türk Standartları Enstitüsünce belirtilen esaslara (TSE 1018'e) göre Kayseri ve Niğde illeri civarından toplanan çiğ süt örnekleri steril 200 ml'lik şişelerde laboratuvara getirilmiştir.

4.2.1. Bakterilerin izolasyonu

Kayseri ve Niğde illeri civarından toplanan çiğ süt örnekleri tek tek sıra ile 1 mL'si 10 mL steril fizyolojik su ile karıştırılmıştır. Homojen hale getirilen örneklerden 10^{-1} den 10^{-7} 'ye kadar seri dilüsyonlar hazırlanmış daha sonra 10^{-3} dilüsyon tüpünden itibaren

MacConkey agar besiyerine 0,1 mL yayma ekim yapıldıktan sonra 37 °C'da 24 - 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. MacConkey agar laktoz(-) olan kolonilerin biyokimyasal özelliklerini belirlemek amacıyla yapılmıştır. İnkübasyon sonunda MacConkey agar besiyerinde gelişen koloniler seçilerek, Setrimit agar besiyer plakalarına çizgi ekim yapılmış ve 37 °C'da 24 - 48 saat inkübasyona bırakılmıştır [34].

İnkübasyondan sonra tesadüfi seçimler yapılmış ve mikroskop altında incelenmiştir. Kültürler Nutrient sıvı besiyerine inoküle edilerek hücre yoğunluğu 600 nm'de 0,3 - 0,5 (OD) olacak şekilde aktive edilmiştir.

4.2.2. Bakterilerin muhafazası

İzole edilmiş suşlar %15 lik gliserolde -20 °C'da muhafaza edilmiştir. Muhafazaya alınan stoklar iki ayda bir yenilenmiştir.

4.2.3. Bakterilerin tanımlanması

İnkübasyon sonucunda üreyen koloniler incelenmiş ve *Pseudomonas*'a benzer olanlar nutrient sıvı besiyerinde geliştirildikten sonra nutrient agar besiyerindeki gelişimine bakılmıştır. Gram boyamaları ve mikroskopik incelemelerinin ardından %1 H₂O₂ katalaz testi yapıp katalaz pozitif olanlar alınmış, + 4 °C de ve + 42 °C de üremeleri bakılmış, Setremitli ve King B'li otamlarda gelişimleri incelendikten sonra stoklara çekilerek +4° C saklanmıştır. *Pseudomonas* spp. olarak tanımlanan suşları daha ileri düzeyde tanımlamak için API 20NE (Biomérieux, Marcy, I'Étoile, France) kiti kullanarak tanımlama yapılmıştır [35].

4.2.4. *Pseudomonas* spp. suşlarının antibiyotik duyarlılık testi

Pseudomonas spp. suşları 37 °C de iki kez ard arda aktive edilmiştir. 121 °C' de 15 dakika otoklavda steril edilmiş olan Mueller Hinton Agar'dan steril petri kaplarına konulmuştur ve donması için oda sıcaklığında bekletilmiştir. Donan besiyer üzerine aktif kültürlerden 100 µl aktarılmıştır ve steril drigalski spatülü ile besiyer üzerine homojen bir şekilde yayılmıştır. Besiyeri ve bakteri içeren petri üzerine denenecek olan antibiyotik diskleri steril koşullarda yerleştirilmiştir ve 37 °C' de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda antibiyotik disk çevresinde oluşan zonların çapı kumpas ile milimetrik olarak ölçülmüştür [36]. Sonuçlar NCCLS kriterlerine göre değerlendirilmiştir [37,38].

4.2.5. *Pseudomonas* spp. suşlarının proteolitik aktiviteleri

Bakterilerin, proteolitik aktivitelerinin incelenmesinde, Skim Milk Agar (SMA) besiyortamı kullanılmıştır. Aktif kültürler, SMA plakları üzerine 10 µL aşlanarak, uygun inkübasyon sıcaklıklarında 48 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda, bakterilerin SMA besi ortamı üzerinde oluşturdukları şeffaf zonlar ölçülmüştür [29].

Besi ortamının içeriği 4.1.2’de belirtildiği gibidir.

4.2.6 *Pseudomonas* spp. suşlarının lipolitik aktiviteleri

Bakterilerin, lipolitik aktivitelerinin incelenmesinde Tribütirin Agar (TA) besiyortamı kullanılmıştır. Aktif kültürler, TA plakları üzerine 10 µL aşlanarak, uygun inkübasyon sıcaklıklarında 48 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda, bakterilerin TA besi ortamı üzerinde oluşturdukları şeffaf zonlar ölçülmüştür [29].

BÖLÜM V

DENEYSEL BULGULAR

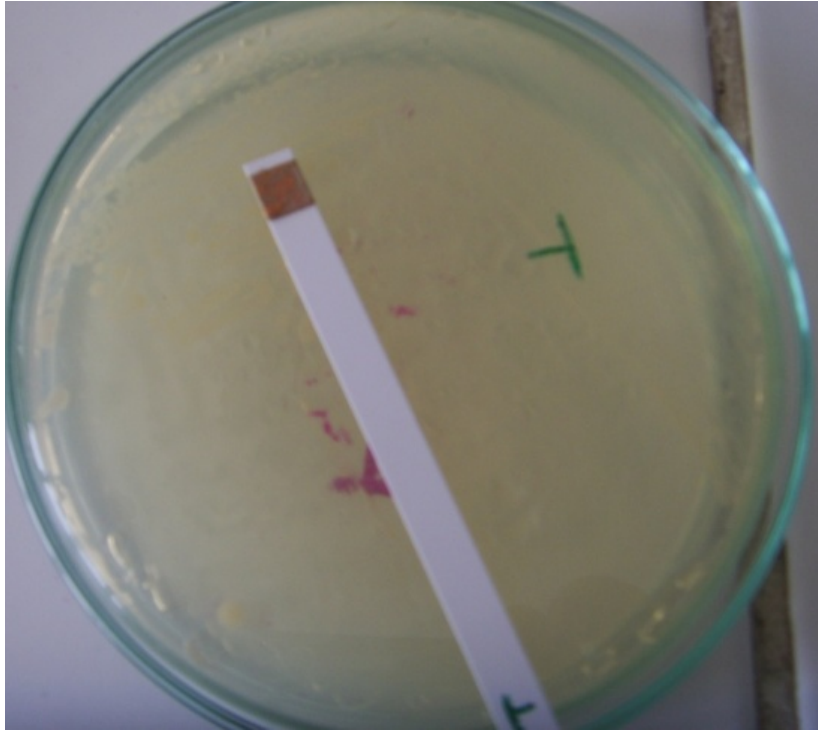
5.1. *Pseudomonas*'ların izolasyonu

Çalışmada 15 adet *Pseudomonas* cinsi bakteri kullanılmıştır. Bu bakterilerin hepsi çiğ süttten izole edilmiştir. (Çizelge 4.1) *Pseudomonas* suşlarının çiğ süttten izolasyonu Bölüm 4.2.1. de anlatıldığı gibi yapılmıştır. İzolatlar gliserollü ortamda muhafazaya alınmıştır.

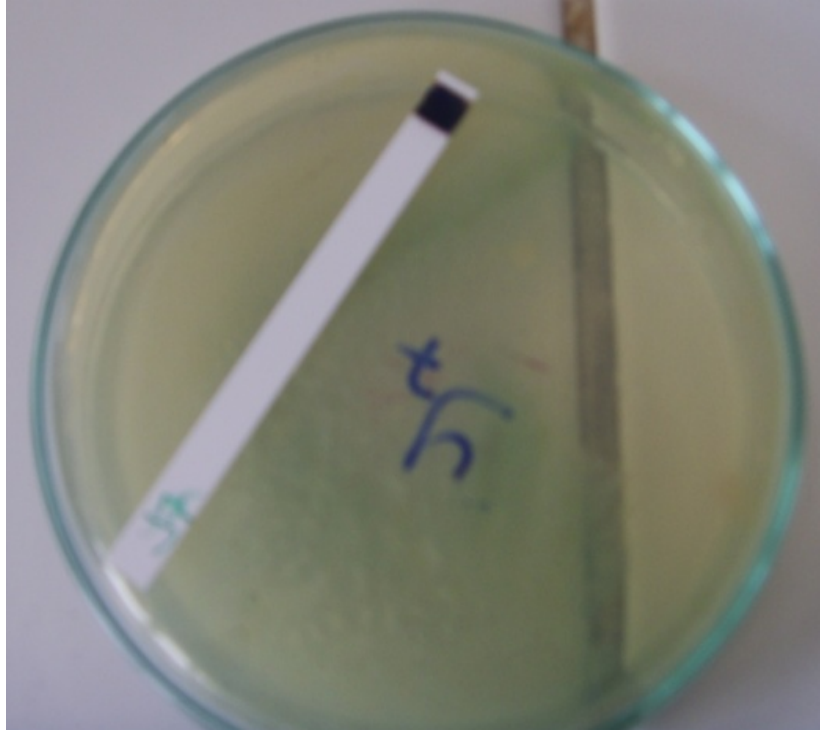
Çalışmada kullanılan *Pseudomonas* suşlarının kod listesi Çizelge 4.1'de verilmiştir.

5.2. *Pseudomonas*'ların tanımlanması

Pseudomonas'ların tanımlanmaları Bölüm 4.2.3. de anlatıldığı gibi yapılmış, API 20NE test sonuçları Fotoğraf 5.3, 5.4, 5.5 ve 5.6'da verilmiştir. Oksidaz testinin sonuçları Fotoğraf 5.1 ve 5.2' de olduğu gibi pozitif ve negatif olarak değerlendirilmiştir.



Fotoğraf 5.1. Oksidaz testi negatif (-) sonucu



Fotoğraf 5.2. Oksidaz testi pozitif (+) sonucu



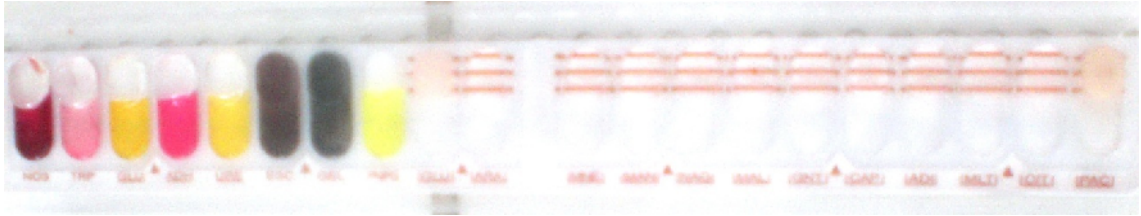
Fotoğraf 5.3. *P. luteola* T₁ suşunun API 20NE 24 saat inkübasyondan sonraki test sonucu



Fotoğraf 5.4. *P. vesicularis* T₃ suşunun API 20NE 24 saat inkübasyondan sonraki test sonucu



Fotoğraf 5.5. *P. aeruginosa* T₅ suşunun API 20NE 48 saat inkübasyondan sonraki test sonucu



Fotoğraf 5.6. *P. fluorescens spp. indologenes* T₁₅ suşunun API 20NE 48 saat inkübasyondan sonraki test sonucu

5.3. *Pseudomonas* spp. suşlarının antibiyotik duyarlılık testi

Pseudomonas spp. suşlarının amfisilin (10 µg), amikasin (30 µg), gentamisin (10 µg), oflaksasin (5 µg), tetrasiklin (30 µg), kloramfenikol (30 µg), sefuroksin (30 µg), antibiyotiklerine duyarlılıkları Bölüm 4.2.4. de verildiği gibi yapılmış ve sonuçlar NCCLS kriterlerine göre değerlendirilmiştir [37,39,40]. Duyarlılık sonuçları ve % duyarlılık oranları Çizelge 5.1 ve Çizelge 5.2’de verilmiştir.

Çalışmada *Pseudomonas* spp. suşlarının kullanılan 7 antibiyotiğe karşı ortalama olarak % 57’sinin duyarlı, %35’inin dirençli ve % 7’sinin orta duyarlı olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 5.2).

P. fluorescens spp. indologenes T₁₂ ve *P. fluorescens spp. indologenes* T₁₅ suşlarının antibiyotiklere duyarlılık test sonuçları sırasıyla, Fotoğraf 5.7 ve 5.8’de verilmiştir.

Çizelge 5.1. *Pseudomonas* spp. suşlarının antibiyotiklere gösterdiği duyarlılık test sonuçları

SUŞLAR	AM	TE	AK	OFX	CN	C	CXM
<i>P.luteola</i> T ₁	-	+	++	++	++	++	-
<i>P.vesicularis</i> T ₂	-	++	++	++	++	++	-
<i>P.vesicularis</i> T ₃	-	++	++	++	-	++	-
<i>P.vesicularis</i> T ₄	-	++	++	++	-	++	-
<i>P.aeruginosa</i> T ₅	-	-	++	++	++	+	-
<i>P.fluorescens</i> <i>ssp.indologenes</i> T ₆	-	-	++	++	++	-	-
<i>P.fluorescens</i> <i>ssp.indologenes</i> T ₇	-	-	++	++	++	-	-
<i>P.fluorescens</i> <i>ssp.indologenes</i> T ₈	-	-	++	++	++	+	-
<i>P.fluorescens</i> <i>ssp.indologenes</i> T ₉	-	+	++	++	++	+	-
<i>P.fluorescens</i> <i>ssp.indologenes</i> T ₁₀	-	+	++	++	++	+	-
<i>P.fluorescens</i> <i>ssp.indologenes</i> T ₁₁	-	++	++	++	++	++	-
<i>P.fluorescens</i> <i>ssp.indologenes</i> T ₁₂	+	++	++	++	++	-	-
<i>P.fluorescens</i> <i>ssp.indologenes</i> T ₁₃	-	++	++	++	++	++	-
<i>P.fluorescens</i> <i>ssp.indologenes</i> T ₁₄	-	++	++	++	++	-	-
<i>P.fluorescens</i> <i>ssp.indologenes</i> T ₁₅	-	++	++	++	++	++	-

AM: Amfisilin TE: Tetrasiklin AK: Amikasin OFX: Ofloksasin CN: Gentamisin C: Kloramfenikol
CXM: Sefuroksin

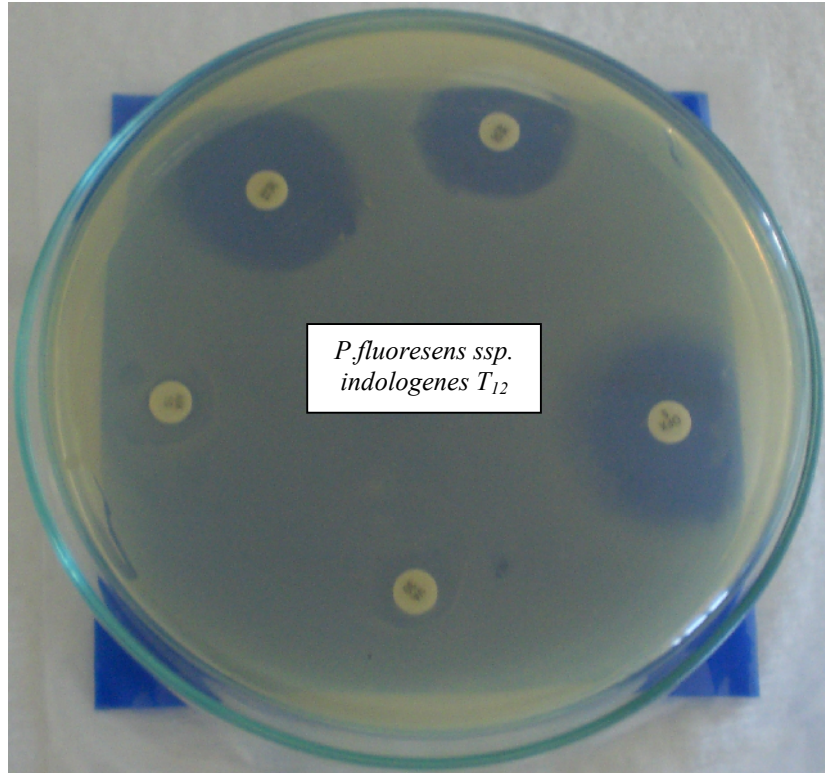
+ : Orta Derecede Duyarlı

++ : Duyarlı

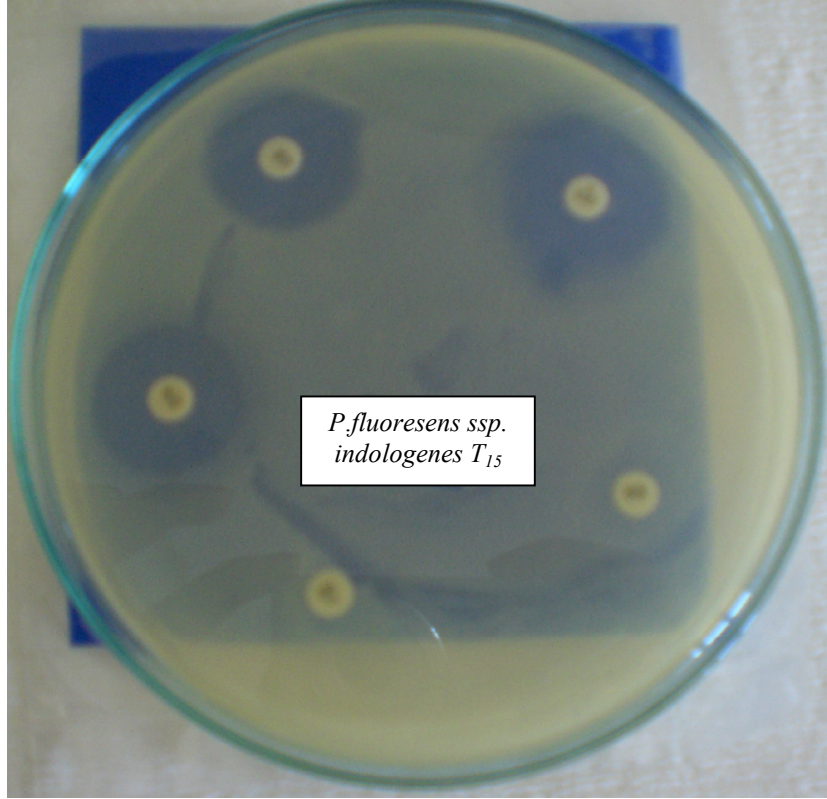
- : Dirençli

Çizelge 5.2. *Pseudomonas* spp. suşlarının antibiyotiklere gösterdiği % duyarlılık oranları

Antibiyotik Adı	Duyarlı	Dirençli	Orta Derecede Duyarlı
Amfisilin	0	93	7
Tetrasiklin	53	27	20
Amikasin	100	0	0
Oflaksasin	100	0	0
Gentamisin	100	0	0
Kloramfenikol	46	27	27
Sefuroksin	0	100	0
Ortalama	57	35	7



Fotoğraf 5.7. *P. fluorescens ssp. indologenes T12* suşunun *P. fluorescens ssp. indologenes T15* suşunun MHA besi ortamında antibiyogram aktivite görüntüsü



Fotoğraf 5.8. *P. fluorescens ssp. indologenes* T₁₅ suşunun MHA besiortamında antibiyogram aktivite görüntüsü

5.4. *Pseudomonas* spp. suşlarının proteolitik aktiviteleri

Çalışmada kullanılan *Pseudomonas* suşlarının Skim Milk Agar (SMA) besiortamında proteolitik aktiviteleri, 4.2.5.' de verildiği gibi tespit edilerek, incelenmiştir. Suşların proteolitik aktiviteleri Çizelge 5.3, Şekil 5.1 ve Fotoğraf 5.9, 5.10' da verilmiştir.

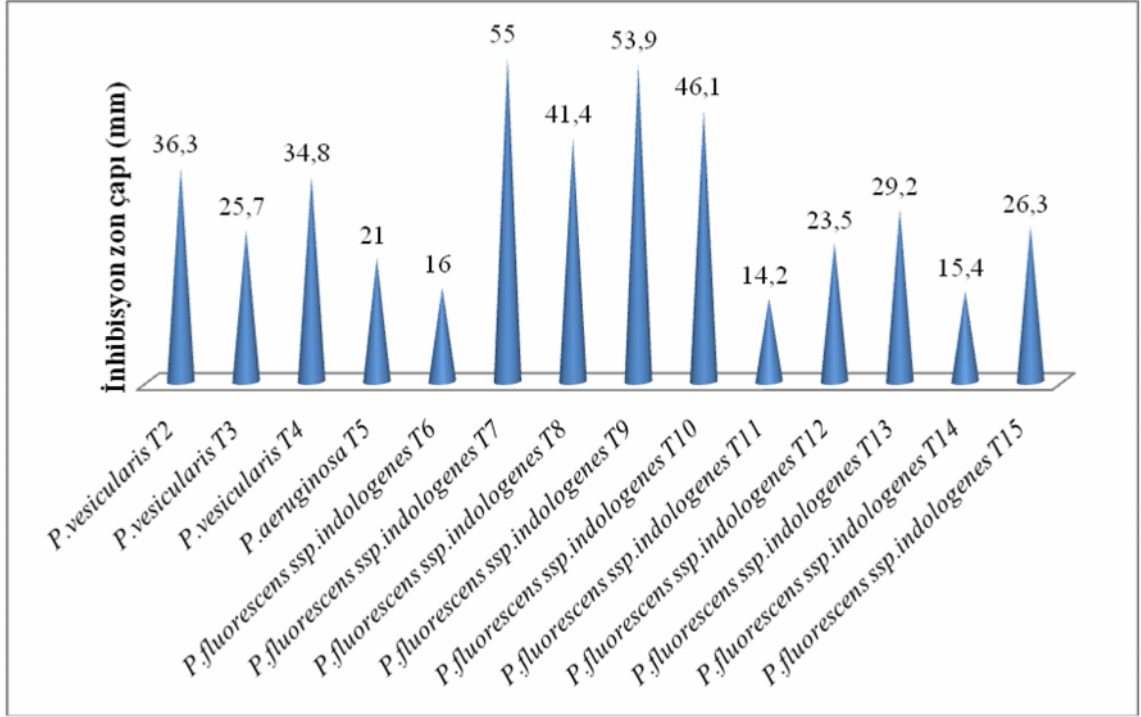
15 adet *Pseudomonas* suşunun 14 adedinde proteolitik aktivite gözlenmiştir. Bu suşlarda proteolitik aktivite, 8,0-55,0 mm zon çapı arasında bulunmuş, ortalama 28,1 mm hesaplanmıştır. En yüksek proteolitik aktivite zon çapı, 55,0 mm ile *P. fluorescens ssp. indologenes* T₇'de bulunmuştur. 1 adet suşa ise proteolitik aktivite belirlenmemiştir.

Çizelge 5.3. *Pseudomonas* spp. suşlarının proteolitik aktivite zon çapları

SUŞLAR	Zon çapı (mm)
<i>P.luteola</i> T ₁	-
<i>P.vesicularis</i> T ₂	36,3±2,9
<i>P.vesicularis</i> T ₃	25,7±4,8
<i>P.vesicularis</i> T ₄	34,8±8,9
<i>P.aeruginosa</i> T ₅	21,0±0,0
<i>P.fluorescens ssp.indologenes</i> T ₆	16,0±0,0
<i>P.fluorescens ssp.indologenes</i> T ₇	55,0±14,1*
<i>P.fluorescens ssp.indologenes</i> T ₈	41,4±16,2
<i>P.fluorescens ssp.indologenes</i> T ₉	53,9±7,8
<i>P.fluorescens ssp.indologenes</i> T ₁₀	46,1±10,0
<i>P.fluorescens ssp.indologenes</i> T ₁₁	14,2±5,7
<i>P.fluorescens ssp.indologenes</i> T ₁₂	23,5±2,4
<i>P.fluorescens ssp.indologenes</i> T ₁₃	29,2±3,1
<i>P.fluorescens ssp.indologenes</i> T ₁₄	15,4±0,6
<i>P.fluorescens ssp.indologenes</i> T ₁₅	26,3±0,9
Ortalama	28,1**

* En yüksek proteolitik aktivite zon çapıdır.

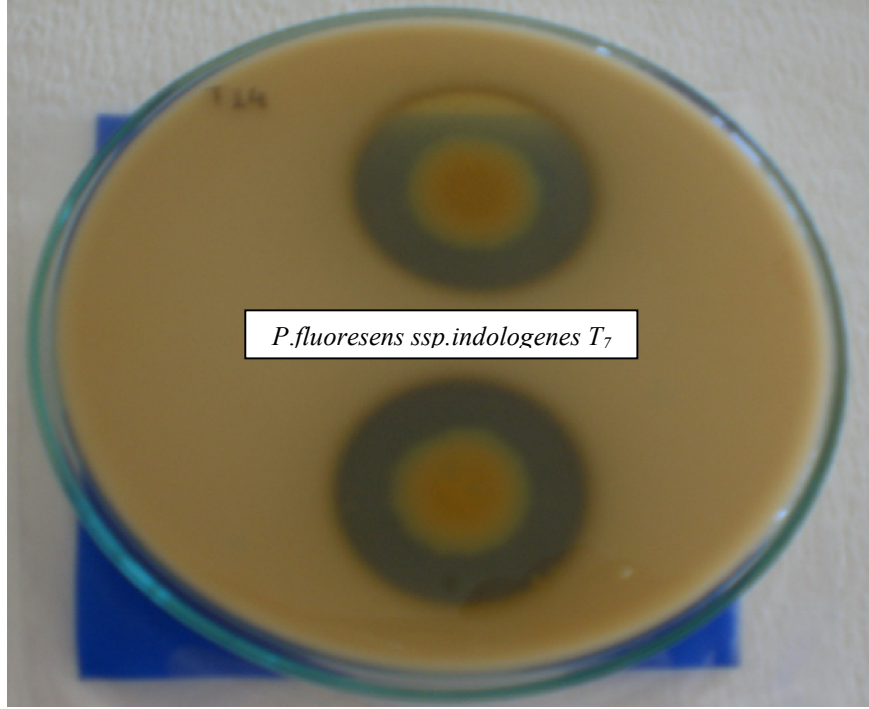
** Ortalama proteolitik aktivite zon çapıdır.



Şekil 5.1. *Pseudomonas* suşlarının SMA besiyortamı üzerinde proteolitik aktivitesi



Fotoğraf 5.9. Proteolitik aktivite göstermeyen *P.luteola* T₁ suşu



Fotoğraf 5.10. *P. fluorescens ssp. indologenes* T₇ suşunun SMA besiyortamı üzerinde proteolitik aktivite görüntüsü

4.5. *Pseudomonas* spp. suşlarının lipolitik aktiviteleri

Çalışmada kullanılan *Pseudomonas* suşlarının Tribütirin Agar (TA) besiyortamında lipolitik aktiviteleri, 4.2.6'da verildiği gibi tespit edilerek, incelenmiştir. Suşların lipolitik aktiviteleri Çizelge 5.4 ve Şekil 5.2'de verilmiştir.

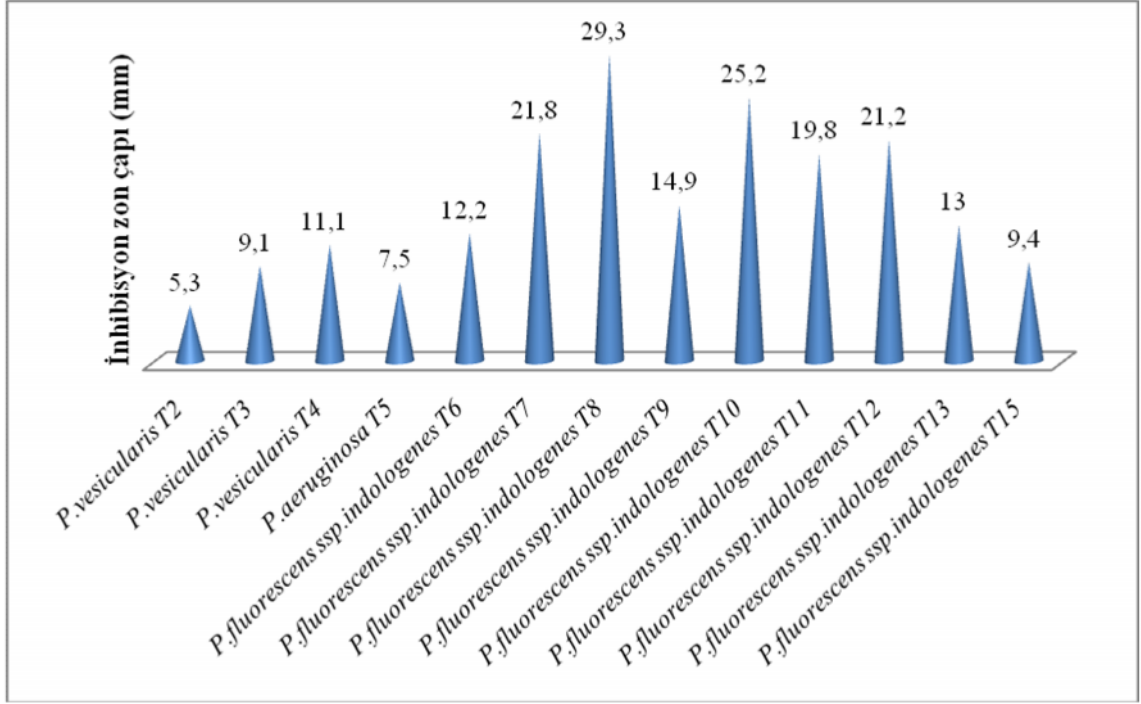
15 adet *Pseudomonas* suşunun 13 adedinde lipolitik aktivite gözlenmiştir. Bu suşlarda lipolitik aktivite, 5,3-29,3 mm zon çapı arasında bulunmuş, ortalama 15,4 mm hesaplanmıştır. En yüksek lipolitik aktivite zon çapı, 29,3 mm ile *P. fluorescens ssp. indologenes* T₈'de bulunmuştur. 2 adet suşa ise lipolitik aktivite belirlenmemiştir.

Çizelge 5.4. *Pseudomonas* spp. suşlarının lipolitik aktivite zon çapları

SUŞLAR	Zon çapı (mm)
<i>P.luteola</i> T ₁	-
<i>P.vesicularis</i> T ₂	5,3±0,2
<i>P.vesicularis</i> T ₃	9,1±0,4
<i>P.vesicularis</i> T ₄	11,1±0,8
<i>P.aeruginosa</i> T ₅	7,5±0,1
<i>P.fluorescens ssp.indologenes</i> T ₆	12,2±1,5
<i>P.fluorescens ssp.indologenes</i> T ₇	21,8±4,9
<i>P.fluorescens ssp.indologenes</i> T ₈	29,3±3,0*
<i>P.fluorescens ssp.indologenes</i> T ₉	14,9±2,4
<i>P.fluorescens ssp.indologenes</i> T ₁₀	25,2±0,6
<i>P.fluorescens ssp.indologenes</i> T ₁₁	19,8±0,7
<i>P.fluorescens ssp.indologenes</i> T ₁₂	21,2±5,4
<i>P.fluorescens ssp.indologenes</i> T ₁₃	13,0±3,9
<i>P.fluorescens ssp.indologenes</i> T ₁₄	-
<i>P.fluorescens ssp.indologenes</i> T ₁₅	9,4±0,6
Ortalama	15,4**

* En yüksek lipolitik aktivite zon çapıdır.

** Ortalama lipolitik aktivite zon çapıdır.



Şekil 5.2. *Pseudomonas* suşlarının TA besiyortamı üzerinde lipolitik aktiviteleri

BÖLÜM VI

TARTIŞMA VE SONUÇ

Gram negatif, basil olan *Pseudomonas* cinsi bakteriler çok geniş bir yayılış alanına sahip olup yaygın olarak toprak, su, kanalizasyon, memeli bağırsakları ve bazı bitkilerde bulunan ve çok farklı ortamlardan kolayca izole edilebilen mikroorganizmalardır [41,42]. *Pseudomonas* türleri soğukta saklanan gıdalarda önemli bozulma nedeni olan organizmalardır. Özellikle süt, tavuk, balık, et ve sebzenin bozulmasından sorumludurlar [43].

Pseudomonas cinsi bakterilerin tanımlanmasında klasik biyokimyasal ve fizyolojik testlerin [44,45,46] yanı sıra Analitik Profil İndeks (API 20 NE) [47, 48], hücresel yağ asitleri analizi [49], SDS-PAGE ile toplam protein profilleri analizi [50,51], 16S rDNA sekans analizi [52,53] ve diğer moleküler analizler [51,53] kullanılmaktadır.

Çalışmada da *Pseudomonas* suşlarının izolasyonu çiğ süt örneklerinden yapılmıştır. Türkiye’de çiğ sütlerden *Pseudomonas* izolasyon çalışmaları çok az sayıdadır. Bu çalışmada, çiğ süt örneklerinden izole edilen toplam 15 adet *Pseudomonas* spp. suşunun tanımlanması için, API 20 NE testi yapılmış ve *P. fluorescens* ssp. *indologenes*, *P. vesicularis*, *P. luteola*, *P. aeruginosa* olmak üzere toplam 4 türe ait suşun %66,7’sinin *P. fluorescens* ssp. *indologenes*, %20’sinin *P. vesicularis*, %6,7’sinin *P. luteola*, %6,7’sinin *P. aeruginosa* türleri olduğu tespit edilmiştir. Araştırmada *Pseudomonas* izolatları içerisinde en fazla izolatın (%66,7) *P. fluorescens* olduğu tespit edilmiştir.

15 adet *Pseudomonas* spp. suşunun in vitro olarak 7 adet antibiyotiğe duyarlılık testi sonuçları Çizelge 5.1. ve 5.2’de verilmiştir.

Antibiyotik direnci, insan, hayvan ve bitki hastalıklarıyla mücadelede önemli bir problem teşkil etmektedir. Direnç mekanizmasını aydınlatma amacıyla yapılan yoğun araştırmalar sınırlı çevrelerden elde edilen genler üzerine odaklanmıştır. Belirlenmiş direnç genlerinin çoğu klinik ve hayvan hastalıklarıyla ilgili bakteriyel izolatlardan keşfedilmiştir. Ancak diğer çevresel antibiyotik direnç kaynakları tam olarak karakterize edilmemiş [54] ve çevreden izole edilen Gram negatif mikroorganizmaların antibiyotik dirençlilikleri ile ilgili çok az bilgi bulunmaktadır [55].

Yapılan bir çalışmada Trakya bölgesinde mastitisli süt ineklerinden izole edilen bakteri suşlarının doksisisiklin (%40), enrofloksasin (%60), gentamisin (%40), linkomisin (%40), ve tetrasikline (%20) antibiyotiklerine duyarlı oldukları rapor edilmiştir [56].

Pseudomonas'lar kullanılan antibiyotiklerin çoğuna dirençlidir. *Pseudomonas*'lar da bulunan çok sayıda plazmidlerin bir kısmı bu bakterileri metabolizma yönünden güçlü kılarken, direnç plazmidleri ise kemoterapötiklere karşı direnç kazanmalarını sağlamaktadır. Ürettikleri potent kromozal β - laktamazlar da β - laktam antibiyotiklere karşı dirençten sorumludurlar [57].

Çalışmada *Pseudomonas* spp. suşlarının kullanılan 7 antibiyotiğe karşı ortalama olarak % 57'sinin duyarlı, %35'inin dirençli ve % 7'sinin orta duyarlı olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 5.2).

Pseudomonas spp. suşlarının amikasin, oflaksasin ve gentamisin antibiyotiklerine yüksek oranda duyarlı (% 100) oldukları belirlenirken, tetrasiklin (% 53) ve kloramfenikol (% 46) antibiyotiklerine daha düşük oranda duyarlılık, Amfisilin ve Sefuroksin antibiyotiklerine ise dirençlilik gösterdikleri tespit edilmiştir (Çizelge 5.2).

Al-Jasser ve Elkhizzi, *P. aeruginosa* klinik izolatlarının, antipseudomonal antibiyotiklere karşı dirençlilik düzeylerini belirlemek için yaptıkları araştırmalarında, suşların duyarlılık oranlarının amikasine karşı % 85,8 gentamisine ise % 81,3 olduğunu tespit etmişlerdir [58].

Ferguson'un yaptığı çalışmada API 20 NE ile tanımlanan *P. aeruginosa* izolatlarının disk difüzyon yöntemi kullanılarak penisilin g, amfisilin, sefalotin, kloksasilin, oxasilin, amoksisilin, sefotaksime, moksalaktam, kloramfenikol ve tetrasiklin dirençli; seftazidim, piperasilin – tazobaktam, sefepim, seftriakson, meropenem, aztreonam, amikasin, apramisin, butirosin a, lividomisin ve kolistin sülfata duyarlı oldukları bulunmuştur [57].

Zer ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, çeşitli klinik örneklerden izole edilen *Pseudomonas* cinsi bakterilerin Kirby- Banuer disk difüzyon yöntemiyle 30 μ g' lık diskler kullanılarak amikasin, aztreonam, sefoperazon, sefotaksim, seftriakson, siprofloksasin, gentamisin, imipenem, piperasilin, tetrasiklin, tobramisine yüksek oranda duyarlı oldukları bulunmuştur [40].

Loureiro ve arkadaşları, 32 adet *P. aeruginosa* suşunun siprofloksasin antibiyotiğine karşı % 100 direnç gösterdiğini bildirilmiştir [59].

Başka bir araştırmada ise *P. aeruginosa*'ya ait 68 adet suşun siprofloksasin direncinin % 22 olarak belirlendiği tespit edilmiştir [60].

Yapılan diğer bir çalışmada ise *P. aeruginosa* suşlarının gentamisin (%75.4), tobramisin (%64.4) ve imipenem (%50) antibiyotiklerine duyarlı, aztreonam (%36), seftazidim (%34), siprofloksasin (%33.1), piperasilin (%27), tikarsilin (%20) antibiyotiklerine ise dirençli oldukları belirlenmiştir [61].

Kontrol bakterisi olarak *P. aeruginosa* ATCC 27853 suşunun kullanıldığı bir araştırmada suşların piperasilin, seftazidim, gentamisin ve aztreonam antibiyotiklerine yüksek oranda dirençli oldukları saptanırken; amikasin, tobramisin ve siprofloksasine düşük oranda dirençli oldukları bulunmuştur [62].

Çalışmada elde edilen sonuçlara göre, *Pseudomonas* spp. suşlarının klinikte tedavi amaçlı kullanılan 7 adet antibiyotikten bazılarına karşı oldukça yüksek duyarlılık gösterirken, bir kısmına ise yüksek dirençlilik göstermiş olmaları dikkat çekicidir. Çalışmanın, çevresel antibiyotik direnç kaynakları ve direnç mekanizmalarının aydınlatılmasına yönelik araştırmalar için önemli olduğu düşünülmektedir.

Çalışmada 15 adet *Pseudomonas* spp. suşunun 14 adedinin proteolitik aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. Bu suşlarda proteolitik aktivite 8,0-55,0 mm zon çapı arasında bulunmuş ve ortalama 28,1 mm hesaplanmıştır (Çizelge 5.3; Şekil 5.1). En yüksek proteolitik aktivite zon çapı, 55,0 mm ile *P. fluorescens* ssp. *indologenes* T₇'de (Fotoğraf 5.10).

Ticari olarak kullanılan enzimlerin %59'unu proteazlar, %28'ini karbohidrazlar, %3'ünü lipazlar ve %10'unu ise diğer enzimler oluşturmaktadır. Karbohidrazlar grubuna giren α -amilaz üretimi %13 ile önemli bir yer tutmaktadır [63]. Mikrobiyal kaynaklı proteaz ve lipazlar, özellikle deterjan ve süt endüstrisinde oldukça önemlidir [64].

Craven ve Macauley sütlerde bozulmadan sorumlu mikroorganizma tiplerini belirlemek amacı ile pastörize sütlerle yaptıkları çalışmalarında izolasyonu ve tanımlamasını

yaptıkları 26 adet *Pseudomonas* spp. suşunun % 5'inin SMA besiortamında 15 mm zon çapı ile proteolitik aktivite gösterdiklerini rapor etmişlerdir [65].

Aynı araştırmacıların başka bir çalışmasında süttten izole edilen *P. fluorescens* suşlarının %10'unun ve *P. putida* suşlarının hepsinin %1'lik skim milk ilaveli nutrient agar besiortamında sırasıyla, 15-17 ve 6 mm zon çaplı proteolitik aktiviteye sahip oldukları tespit edilmiştir [66].

Mikrobiyal suşların büyük bir çoğunluğu lipaz enziminin üretiminde kullanılmasına rağmen, *Pseudomonas*, *Candida* ve *Rhizopus* cinsi mikroorganizmalar bu enzimin üretiminde kullanılan en önemli kaynaklardır [67,68].

Çalışmada 15 adet *Pseudomonas* spp. suşunun 13 adedinde lipolitik aktivite gözlenmiştir. Bu suşlarda lipolitik aktivite, 5,3-29,3 mm zon çapı arasında bulunmuş ve ortalama 15,4 mm hesaplanmıştır (Çizelge 5.4; Şekil 5.2). En yüksek lipolitik aktivite zon çapı, 29,3 mm ile *P. fluorescens* ssp. *indologenes* T₈'de bulunmuştur.

Rajmohan ve arkadaşları, 37 adet *P. fluorescens* suşunun TA besiortamında lipolitik aktiviteleri araştırılmış ve bütün izolatların farklı derecelerde enzimatik aktivite gösterdiğini rapor etmişlerdir [29].

Süttten izole edilen *P. fluorescens* suşlarının %15'inin %1'lik tribütirin ilaveli nutrient agar besiortamında 20 mm zon çaplı lipolitik aktiviteye sahip olduğu tespit edilmiştir [66].

Yuvalı Çelik, Gökçen, 30 adet *Pseudomonas* spp. suşunun 17 adedinde 14,8-32,8 mm zon çapı arasında lipolitik aktivite gösterdiğini tespit etmiştir [33].

Craven ve Macauley, pastörize sütlerle yaptıkları çalışmalarında lipolitik aktiviteye sahip 51 adet *Pseudomonas* spp. suşunun % 25'inin 22 mm zon çapı ile lipolitik aktivite gösterdiğini bildirmişlerdir [65].

Çalışmada, proteolitik ve lipolitik aktivite gösteren *Pseudomonas* spp. suşlarının oldukça yüksek aktiviteye sahip oldukları tespit edilmiştir. Proteolitik ve lipolitik enzimlerle ilgi literatür bilgilerinde de *P. fluorescens* [69,70], *P. aeruginosa* [71,72] türleri ile yapılmış çalışmalar oldukça yoğundur ve sonuçlarımızı desteklemektedir.

Antibiyotik direnci, insan, hayvan ve bitki hastalıkları ile mücadele konusunda önemli bir problemdir. Son yıllarda antibiyotik direnç kaynakları üzerinde yapılan araştırmalar oldukça yoğunluk kazanmaktadır. Çalışmada *Pseudomonas* suşlarının antipseudomonal tedavi amaçlı kullanılan 7 adet antibiyotikten bir kısmına duyarlı iken, bazılarında da dirençlilik göstermiş olmaları, çevresel antibiyotik direnç kaynakları ve direnç mekanizmalarının aydınlatılmasına yönelik daha detaylı çalışmalara yardımcı olabileceğini düşündürmektedir.

Çalışmada 15 adet suşun hem proteolitik hem de lipolitik aktivitelerinin oldukça yüksek olması, bu suşların enzimlerinin saflaştırılması ve özelliklerinin belirlenmesi durumunda ticari enzim uygulamalarında endüstriyel kullanım için potansiyel olabilecekleri düşünülmektedir.

Araştırma bulguları çiğ süt ve ürünlerinin *Pseudomonas*'lar tarafından kontamine olabilme durumunu göstermektedir. Farklı kaynaklardan süte karışan *Pseudomonas*'lar sütte hızlı bir şekilde gelişerek, çeşitli fermantasyonlara, parçalanmalara sebep olmakta ve bu faaliyetler sonucunda süütün renginde, tadında, kokusunda, yapı ve kıvamında değişikliklere ve bazen de çeşitli enfeksiyonlara neden olmaktadır. Bu durum süt ve süt ürünlerinde *Pseudomonas*'ların bulunmaması için yeterli tedbirlerin tüketiciler ve işletmeciler tarafından alınması gerekliliğini göstermektedir.

KAYNAKLAR

- [1] Frazier, W.C., Westhoff, D.C., Food Microbiology, Mc Graw-Hill inc. Singapore, 461s., 1988.
- [2] Akoğlu, A., iğ sütte *pseudomonas aeruginosa* sayılması için yöntem modifikasyonları üzerine alışmalar, Yüksek Lisans Tezi, A. Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 2006.
- [3] Uraz G., ıtak S., eşitli Yrelerden Sağlanan iğ Süt rneklerinden *Pseudomonas*' ların İzolasyonu ve Türlerin Dağılımlı zerine Bir Araştırma Gazi Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Genel Biyoloji Ana Bilim Dalı, Mikrobiyoloji Bilim Dalı, Ankara-TÜRKİYE 1998.
- [4] Altun B., Besler T., nal S., Ankara'da piyasasında satılan işlem görmüş ve görmemiş sütlerin makro-besin değeri ve mikrobiyolojik açıdan değerlendirilmesi, sted, cilt 11, sayı :2 : 51, 2002.
- [5] Kalkan S., iğ sütte *Bacillus cereus* sayılması için yöntem modifikasyonları üzerine alışmalar, Ankara nv. Gıda Müh Ana bilim dalı yüksek lisans tezi, Ankara, 2006.
- [6] İnternet: *Pseudomonas*, <http://www.wikipedia.com>.
- [7] Aydın, F., eşitli Klinik rneklerden İzole Edilen *Pseudomonas aeruginosa* Suşlarının Değişik Yöntemlerle eşitli Antimikrobiyellere Duyarlılıklarının Araştırılması. A.. Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Ana Bilim Dalı Uzmanlık Tezi, Ankara, 2001.
- [8] Pelczar, J.M and Reid, D.R., Microbiology, Kogakusha Company Ltd., s:125, Tokyo, 1958.
- [9] Tortora, J.G., Funke, R.B. and Case L.C., Microbiology, The Benjamin Cummings Publishing Company Inc., 523 s., Californina, 1992.
- [10] Ayhan, K., Gıdalarda bulunan mikroorganizmalar, Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları, Ankara Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü yayını, sim matbaacılık ltd., 522 s., Ankara, 2000.

- [11] İnternet: <http://www.mikrobiyoloji.org>, 2004.
- [12] Davis, D.B., Dulbecco, R., Eisen, H., Ginsberg, H.S. and Wood, W.B., Microbiology. 756–757. Hober Medical Division, 774 s., New York, 1968.
- [13] Aydın, F., Çeşitli Klinik Örneklerden İzole Edilen *Pseudomonas aeruginosa* Suşlarının Değişik Yöntemlerle Çeşitli Antimikrobilyellere Duyarlılıklarının Araştırılması. A.Ü. Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Ana Bilim Dalı Uzmanlık Tezi, Ankara, 2001.
- [14] İnternet: Akoğlu, Ş.A., Halkman A.K., Çiğ sütte *pseudomonas aeruginosa* sayılması için yöntem modifikasyonları üzerine çalışmalar, orlab-on-line mikrobiyoloji dergisi, cilt 4, sayı 2, sayfa 2-13, www.mikrobiyoloji.org/pdf/702060202.pdf, 2006.
- [15] Baştürk, S., *Escharia Coli, Klebsiella Pneumoniae, Pseudomonas Aeruginosa* ve *Acinetobacter Baumannii* suşlarında çeşitli kinolon grubu antibiyotiklerin duyarlılıklarının araştırılması, Uzmanlık tezi, İstanbul, 2005.
- [16] Collier, L., Balow, A., Sussman, M., Topley & Wilson's Microbiology and Microbiol Infections, Systematic Bacteriology, 9th edition, 2: 1091-1118, 1998.
- [17] Sneath, P.H. A., Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Edited by P.H.A. Sneath, N.S., Mair, M.E., Sharpe, J.G. Holt, Williams and Wilkins, Volume 2, 1 Baltimore, 141-199, 1986.
- [18] *Pseudomonas genome* Project, <http://www.pseudomonas.com>.
- [19] İnternet: Kılıç, H., Temel Tıp, Mikrobiyoloji, Ders Notları, *pseudomonas.pdf*, <http://tip.erciyes.edu.tr>
- [20] Ulusoy S., Yoğun bakım ünitelerinden izole edilen *P.aeruginosa* suşlarında n-açıl homoserin laktam üretiminin araştırılması, SDÜ Doktora Tezi, 2007.
- [21] Özan, M., Garnizondaki askeri birliklerin içme sularında membran filtrasyon tekniği ile *Pseudomonas aeruginosa*'nın izolasyonu ve idenfikasyonu üzerine araştırmalar, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Ens. Bilim Uzmanlığı, Yüksek Lisans Tezi, Ankara, 1996.

- [22] Keskin, D., *Pseudomonas* türlerinin gıdalardaki önemi, Arşiv, 16:185, Andan Menderes Üniversitesi, Çine Meslek Yüksek Okulu, Çine, Aydın, 2007.
- [23] İnternet: Akoğlu, Ş.A., Halkman A.K., Çiğ Sütte *Pseudomonas aeruginosa* sayılması için yöntem modifikasyonları üzerine çalışmalar, orlab on-line mikrobiyoloji dergisi Cilt 4, Sayı 4, Sayfa 21, www.mikrobiyoloji.org/pdf/702060402.pdf, 2006.
- [24] Tanır, G., Göl, N., Antibiyotik direnci, klinik dergisi .cilt 12, sayı:2, sayfa 47- 54, 1999.
- [25] İnternt: Türet. S., Antibiyotiklerin etki mekanizmaları, Gazi Üni., Ankara.
- [26] Nwosu, V.C., Antibiotic resistance with particular reference to soil microorganisms, Research in Microbiology, 152: 421-430, 2001.
- [27] Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları, Sim Matbacılık Ltd. Şti., Ankara, 2000.
- [28] Koka, R. and Weimer, B.C., Isolation and characterization of a protease from *Pseudomonas fluorescens* RO98, Journal of Applied Microbiology, 89: 280-288, 2000.
- [29] Rajmohan, S., Dodd, C.E.R. and Waites, W.M., Enzymes from isolates of *Pseudomonas fluorescens* involved in food spoilage, Journal of Applied Microbiology, 93: 205-213, 2002.
- [30] Kıran, Ö.(1), Çömlekçiöğlü, U.(1), Dostbil, N.(2), Bazı mikrobiyal enzimler ve endüstrideki kullanım alanları, Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Kahramanmaraş (KSU, Journal of Science And Engineering 9(1), Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Van(2), 2006.
- [31] Arpigny, J.A. and Jaeger, K.E., Bacterial lipolytic enzymes: classification and properties, Biochemical Journal, 343: 177-183, 1999.
- [32] Saraç, N.(1), Boran R.(2), Ökmen G.(2), Uğur, A.(2), Toprak ve süt kökenli gram pozitif bakterilerde lipaz üretimi, Muğla Üniversitesi, Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu, Tıbbi Laboratuar Programı, 48700, Marmaris/Muğla(1), Muğla

Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, 48170, Kötekli/ Muğla(2), 2008.

- [33] Çelik Yuvalı, G., *Pseudomonas* cinsi bakterilerin bazı metabolik aktivite, antimikrobiyal etki ve protein profillerinin incelenmesi, Doktora tezi, Gazi Üniversitesi, Ankara, 2005.
- [34] Lafferty, R.M., Korsatko, B. and Korsatko, W., Microbial production of poly- β -hydroxybutyric acid, *Biotechnology*, edited by H.J. Rehm and G. Reed, Volume 6b, Special Microbial Processes, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, 137-173, 1988.
- [35] Poirier, Y., Polyhydroxyalkanoate synthesis in plants as a tool for biotechnology and basic studies of lipid metabolism, *Progress in Lipid Research*, 41: 131-155, 2002.
- [36] Padilla, C., Brevis, P., lobos, O., Hubert, E. and Zamorano, A., Production of antimicrobial substances, by hospital bacteria, active against other microorganisms, *Journal of Hospital Infection*, 49: 43-47, 2001.
- [37] NCCLS, Performance Standarts For Antimicrobial Disk Susceptibility Test, 4th Edition, National Committee for Clinical Laboratory Standarts, Philadelphia, 8 (7): Tentative Standart. M2-T7, 1988.
- [38] Murray, P. R., Baron, E. J., Pfaller, M. A., Tenover, F.C., Tenover, R.H., *Manual of Clinical Microbiology*, 6th Edition, ASM Pres., Woods, G. L. and Washington, D. C, 1327-1341, 1995.
- [39] Dülger, B.(1), Arslan, Ü.(2), *Coriolus versicolor* (L. ex Fr.) Quel. Makrofungusunun Antimikrobiyal Aktivitesi, 385 Tr. *J. of Biology* 23 385–392, Uludağ Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü(1), Uludağ Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü(2), Bursa, 1999.
- [40] Zer, Y., Balcı, İ., Karslıgil, T., Bayram, A., Ekşi F., Çeşitli örneklerden izole edilen *pseudomonas* 'ların tiplendirilmesi, antibiyotik duyarlılıkları ve sefepimin anti *pseudomonas* etkinliği, *klirik dergisi*, cilt 13, sayı:1, s: 33-35, 2000.

- [41] Michel-Briand, Y. and Baysse, C., The pyocins of *Pseudomonas aeruginosa*, *Biochimie*, 84: 499-510, 2002.
- [42] Kimata, N., Nishino, T., Suzuki, S. and Kogure, K., *Pseudomonas aeruginosa* isolated from marine environments in Tokyo Bay, *Microbial Ecology*, 47: 41-47, 2004.
- [43] Gram, L., Inhibitory effect against pathogenic and spoilage bacteria of *Pseudomonas* strains isolated from spoiled and fresh fish, *Applied and Environmental Microbiology*, 59 (7): 2197-2203, 1993.
- [44] Costas, M., Holmes, B., Sloss, L.L. and Heard, S., Investigation of a *pseudo-outbreak* of '*Pseudomonas thomasi*' in a special-care baby unit by numerical as of SDS-PAGE protein patterns, *Epidemiology and Infection*, 105 (1): 127-137, 1990.
- [45] Gram, L., Wedell-Neergaard, C. and Huss, H. H., The bacteriology of fresh and spoiling Lake Victorian Nile perch (*Lates niloticus*), *International Journal of Food Microbiology*, 10: 303-316, 1990.
- [46] Tryfinopoulou, P., Tsakalidou, E. and Nychas, G.-J. E., Characterization of *Pseudomonas* spp. associated with spoilage of gilt-head sea bream stored under various conditions, *Applied and Environmental Microbiology*, 68: 65-72, 2002.
- [47] Wiedmann, M., Weilmeier, D., Dinen, S.S., Ralyea, R. and Boor, K.J., Molecular and phenotypic characterization of *Pseudomonas* spp. isolated from milk, *Applied and Environmental Microbiology*, 66 (5): 2085-2095, 2000.
- [48] Vachée, A., Mossel, D.A.A. and Leclerc, A., Antimicrobial activity among *Pseudomonas* and related strains of mineral water origin, *Journal of Applied Microbiology*, 83: 652-658, 1997.
- [49] Oyaizu, H. and Komagata, K., Grouping of *Pseudomonas species* on the basis of cellular fatty acid composition and the quinone system with special reference to the existence of 3-hydroxy fatty acids, *Journal of General and Applied Microbiology*, 29: 17-40, 1983.

- [50] Khan, F.G., Rattan, A., Khan, I, A., A preliminary study of fingerprinting of *Pseudomonas aeruginosa* by whole cell protein analysis by SDS-PAGE, Indian Journal of Medical Research, 104: 342-348, 1996.
- [51] Scortichini, M., Marchesi, U., Rossi, M.P. and Prospero, P.D., Bacteria associated with hazelnut (*Corylus avellana* L.) decline are of two groups: *Pseudomonas avellanae* and strains resembling *P. syringae* pv. *syringae*, Applied and Environmental Microbiology, 68 (2): 476-484, 2002.
- [52] Cho, J.C. and Tiedje, J.M., Biogeography and degree of endemicity of *fluorescent Pseudomonas* strains in soil, Applied and Environmental Microbiology, 66 (12): 5448-5456, 2000.
- [53] Coenya, T., Goris, J., Spilker, T., Vandamme, P. and Lipuma, J.J., Characterization of unusual bacteria isolated from respiratory secretions of cystic fibrosis patients and description of *Inquilinus limosus* gen. Nov., sp. nov., Journal of Clinical Microbiology, 40 (6): 2062-2069, 2002.
- [54] Riesenfeld, C.S., Goodman, R.M. and Handelsman, J., Uncultured soil bacteria are a reservoir of new antibiotic resistance genes, Environmental Microbiology, 6: 981-990, 2004.
- [55] Ladapo, J.A. and Nwosu, V.C., Growth response of landfill bacteria to different concentrations of heavy metals, Journal of Environmental Biology, 20: 1-5, 1999.
- [56] Ak S., Horoz H., Ilgaz A., Trakya bölgesinde sığır mastitisinden sorumlu bulaşıcı ve çevresel bakteriyel etkenler ve antibiyotiklere duyarlılıkları.
- [57] Ferguson D., A Study of clinical strains of *Pseudomonas Aeruginosa* and the investigation of antibiotic resistance mechanism in the multidrug resistant strain PA13, School Of Biotechnonology , Dublin City University, 2008.
- [58] Al-Jasser, A.M. and Elkhizzi, N.A., Antimicrobial susceptibility pattern of clinical isolate *Pseudomonas aeruginosa*, Saudi Medical Journal, 25 (6): 780-784, 2004.
- [59] Loureiro, M.M., de Moraes, B.A., Mendonça, V.L, F., Quadra, M.R.R., Pinheiro, G.S. and Asensi, M.D., *Pseudomonas aeruginosa*: Study of antibiotic resistance

and molecular typing in hospital infection cases in a Neonatal Intensive Care Unit from Rio de Janeiro City, Brazil, *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 97 (3): 387-394, 2002.

- [60] Mylotte, J., Graham, R., Kahler, L., Young, L. and Goodnough, S., Epidemiological of nosocomial and resistant organisms in patients admitted for the first time to a rehabilitation unit, *Clinical Infectious Diseases*, 30: 425-432, 2000.
- [61] Kurtoğu, M., Bozkurt , H., Yaman, G., Aygöl, K., Bayram, Y., Berktaş, M., *Pseudomonas aeruginosa* suşlarının antimikrobik direnci , *selçuk tıp dergisi*, 25:1-6, 2008.
- [62] Gültekin B., Eyigör M., Aydın N., Çeşitli klinik örneklerden izole edilen *pseudomonas* kökenlerinin antibiyotik direnci.
- [63] Wiseman, A., *Handbook of Enzymes Biotechnology*. Second Edition. Chapter 3. The Application of Enzymes in Industry p. 274-373, 1987.
- [64] Maliszewska, I. and Sroka, Z., The effect of culture conditions on proteolytic productivity of lipolytic microorganisms, *Acta Biotechnology*, 9 (1): 49-54, 1989.
- [65] Craven, H.M. and Macauley, B.J., Microorganisms in pasteurised milk after refrigerated storage 3. effect of milk processor, *The Australian Journal of Dairy Technology*, 42:50-55, 1992(b).
- [66] Craven, H.M. and Macauley, B.J., Microorganisms in pasteurised milk after refrigerated storage 1. identification of types, *The Australian Journal of Dairy Technology*, 42: 38-45, 1992(a).
- [67] Dong, H., Gao, S., Han, S. and Cao, S., Purification and characterization of a *Pseudomonas* spp. lipase and its properties in *non-aqueous* media, *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 30: 251-256, 1999.
- [68] Pandey, A., Benjamin, S., Soccol, C.R., Nigam, P., Krieger, N. and Soccol, V.T., The realm of microbial lipases in biotechnology, *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 29: 119-131, 1999.

- [69] Wang and Jayarao, Minnesota-South Dakota Dairy Food Research Center, Department of Dairy Science, South Dakota State University, Brookings, 57006-0647, 2001.
- [70] Nikolaev, Y.A. and Panikov, N.S., Extracellular protease as a reversible adhesion regulator in *Pseudomonas fluorescens*, *Microbiology*, 71 (5): 629-634, 2002.
- [71] Brahim-horn, M.C., Mickelson, C.A., Gaal, A.M., Guglielmino, M.G. and Sparrow, L.G, Lipolytic activity produced by *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter calcoaceticus* strains grown in wool-scour effluent. *Enzyme Microbiol Technol* 13: 740-746, 1991.
- [72] Sharon, C., Furugoh, S., Yamakido, T., Ogawa, Hl. and Kato, Y., Purification and characterization of a lipase from *Pseudomonas aeruginosa* KKA-5 and its role in castor oil hydrolysis, *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 20: 304-307, 1998.