

T.C.
KIRIKKALE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

TOPRAK İZOLATI *BACILLUS* SP. TÜRLERİNDE SİDEROFOR
OPTİMİZASYONU

SELMA KÖRÇOBAN

TEMMUZ 2020

Biyoloji Anabilim Dalında Selma KÖRÇOBAN tarafından hazırlanan TOPRAK İZOLATI *BACILLUS* SP. TÜRRLERİNDE SİDEROFOR OPTİMİZASYONU adlı Yüksek Lisans Tezinin Anabilim Dalı standartlarına uygun olduğunu onaylarım.

Doc. Dr. Yasin DEMİRBAŞ

Prof. Dr. Aysun ERGENE

Anabilim Dalı Başkanı V.

Y. Demirbaş

Bu tezi okuduğumu ve tezin **Yüksek Lisans Tezi** olarak bütün gereklilikleri yerine getirdiğini onaylarım.

Prof. Dr. Sema ÇETİN

Danışman

Prof. Dr. Hikmet TÜRK KATIRCIOĞLU

Ortak Danışman

Jüri Üyeleri

Başkan	: Prof. Dr. Beril SALMAN AKIN	<i>B. Salman</i>
Üye (Danışman)	: Prof. Dr. Sema ÇETİN	<i>Sema Çetin</i>
Üye (Ortak Danışman):	Prof. Dr. Hikmet KATIRCIOĞLU	<i>Hikmet</i>
Üye	: Prof. Dr. Serpil OĞUZTÜZÜN	<i>Serpil Oğuztüzün</i>
Üye	: Prof. Dr. Nazife YİĞİT KAYHAN	<i>Nazife Yiğit Kayhan</i>

...../...../.....

Bu tez ile Kırıkkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu Yüksek Lisans derecesini onaylamıştır.

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Prof. Dr. Recep ÇALIN

ÖZET

TOPRAK İZOLATI *BACILLUS* SP. TÜRLERİNDE SİDEROFOR OPTİMİZASYONU

KÖRÇOBAN, Selma

Kırıkkale Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Prof. Dr. Sema ÇETİN

Ortak Danışman: Prof.Dr. Hikmet TÜRK KATIRCIOĞLU

Temmuz 2020, 65 sayfa

Sideroforlar, hücre dışına salgılanan düşük moleküler ağırlıklı ribozomal olmayan peptidlerdir. Günümüzde bu peptidler sağlık, kozmetik, tarım ilaçları gibi birçok endüstriyel ürünlerde değerlendirilebilecek bir metabolit olarak oldukça dikkat çekicidir. Bu nedenle son yıllarda sideroforların analizi, biyosentez yolları, transportu ve ürün içinde kullanılabilirliğine yönelik birçok araştırma mevcuttur. Demir elementi insan, bitki, hayvan ve mikroorganizmalarda büyüme, gelişme gibi pek çok fizyolojik olaylarda gereklidir. Noksanlılığı ve fazlalığı canlılarda hastalıklara sebep olmaktadır.

Sideroforlar, bilinen en büyük Fe^{+3} bağlayıcılarıdır, mikroorganizmaların yaşamlarının sürdürülmesinde, ekosistemin iyileştirilmesinde, tıpta bazı klinik uygulamalarda önemli rol almaktadır. Bu araştırmanın amacı, mikrobiyal kökenli sideroforun yüksek verimlilikte eldesine yönelik olarak tarımsal uygulamaların yapıldığı topraklardan izole edilen ve tanımlanan, siderofor ürettiği tespit edilen *Bacillus subtilis* DY3 , *Bacillus subtilis* DY5 , *Bacillus pumilus* 44/ 1 bakterilerinde siderofor üretim optimizasyonunu gerçekleştirmektir. Kontrol amaçlı olarak *Escherichia coli* KKÜ ve *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 bakterileri kullanılmıştır. Optimizasyona yönelik olarak incelenen farklı sıcaklık, pH, biyomas miktarı, karbon kaynağı ve zaman parametreleri değerlendirilmiştir. Bu sonuçlara

göre en yüksek siderofor miktarı *Bacillus pumilus* 44/1'de % 47,8 olarak tespit edilmiştir. *Bacillus pumilus* 44/1 için optimum siderofor üretimi 30°C'de, pH 5.2'de 1 M melas varlığında, 1.5/100 oranında inoküle edildiğinde 48 saat olarak belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Siderofor, Demir alımı, Siderofor optimizasyonu



ABSTRACT

SOIL ISOLATION BACILLUS SP. SIDEROPHORE OPTIMIZATION IN SPECIES

KÖRÇOBAN, Selma

Kırıkkale University

Graduate School Of Natural And Applied Sciences

Department of Biology, MSc. Thesis

Supervisor: Prof. Dr. Sema ÇETİN

Co-Supervisor: Prof.Dr. Hikmet TÜRK KATIRCIOĞLU

July 2020, 65 Pages

Siderophores are low molecular weight non-ribosomal peptides secreted out of the cell. Today, these peptides are remarkable as a metabolite that can be evaluated in many industrial products such as health, cosmetics and pesticides. For this reason, in recent years there has been a lot of research into the analysis, biosynthesis pathways, transport and availability of siderophores within the product. Iron is a necessary trace element in many physiological events such as a growth and development in human, plant, animal and microorganisms. Deficiency and excess of iron cause diseases in living things.

Siderophores, known the largest Fe^{+3} binders, play an important role in the survival of microorganisms, improvement of the ecosystem, and some clinical applications in medicine. The aim of this research is to perform siderophore production optimization in *Bacillus subtilis* DY3, *Bacillus subtilis* DY5, *Bacillus pumilus* 44/1 bacteria, which are isolated and identified from the soil where agricultural applications are made, for the high efficiency of microbial origin siderophore. *Escherichia coli* KKÜ and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 bacteria were used for control purposes. Different temperature, pH, biomass amount, carbon source and time parameters examined for optimization were evaluated. According to these results, the highest siderophore amount was determined as 47.8% in *Bacillus pumilus* 44/1. Optimum

siderophore production for *Bacillus pumilus* 44/1 was determined as 48 hours at 30 °C, pH 5.2 in the presence of 1 M molasses, when inoculated at a rate of 1.5/100.

Key Words: Siderophore, Iron intake, Siderophore optimization



TEŞEKKÜR

Tez çalışmam sırasında kıymetli bilgi, birikim ve tecrübeleri ile bana yol gösterici olan, ilgisini ve önerilerini göstermekten kaçınmayan değerli danışman hocam sayın Prof. Dr. Sema ÇETİN'e;

Laboratuvar çalışmalarım boyunca her konuyu danışabildiğim, her zaman desteğini ve sonsuz sabrını gördüğüm, enerjisi ve kahkahalarıyla çalışma ortamımı güzelleştiren değerli hocam Prof. Dr. Hikmet TÜRK KATIRCIĞOLU'na;

Lisans ve yüksek lisans eğitimim boyunca üniversite dönemimi güzelleştiren ve her konuda bana destek olan değerli arkadaşım Burak GÜRKAN'a;

Çalışma ortamımı neşeli hale getiren, beni aç bırakmayan ve yardımlarını hiç bir zaman esirgemeyen çok değerli laboratuvar arkadaşlarım Gönül MUTLU ve Aybuke Sultan KOCA YILMAZ'a;

Çalışmalarım boyunca maddi manevi destekleriyle beni hiçbir zaman yalnız bırakmayan aileme;

Hayatıma girdiği andan itibaren her koşulda yanımda olan, sabırla benimle birlikte mücadele eden Yücel YEŞİLÖZ'e bana kattıkları her şey için sonsuz teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

Sayfa

ÖZET	i
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	x
KISALTMALAR DİZİNİ	xi
1. GİRİŞ	1
1.1. Siderofor ve Önemi	3
1.2. Mikrobiyal sideroforların uygulama alanları	6
1.3. Siderofor üreten mikroorganizmalar	7
2. MATERYAL VE YÖNTEM	8
2.1. Materyal	8
2.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler	8
2.1.2. Kullanılan Besiyerleri	10
2.1.3. Kullanılan Test Bakterileri	14
2.2. Metod.....	14
2.2.1. Test Bakterilerinin Aktifleştirilmesi.....	14
2.2.2. Siderofor Üretiminin Tespiti.....	14
a. Chrome Azurol Sulfonate Agar Deneyi.....	15
b. Chrome Azurol Sulfonate Sıvı Deneyi.....	15
2.2.3. Üretim yüzdesinin Belirlenmesi.....	16
2.2.4. Maksimum Üretim Zamanının Belirlenmesi.....	16
2.2.5. Siderofor Üretiminin Optimizasyonu.....	17

a. Sıcaklığın Etkisi.....	17
b. pH'ın Etkisi.....	18
c. Farklı Karbon Kaynaklarının Etkisi.....	18
d. Biyomas Etkisi.....	19
3. ARAŞTIRMA BULGULARI	20
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA.....	36
KAYNAKLAR	45



ŞEKİLLER DİZİNİ

ŞEKİL

Sayfa

1.2. Siderofor Aracılığıyla Demirin Hücre İçine Taşınması.....	5
1.3.3.1 Sideroforlar Aracılığı İle Pas Giderimi.....	7
2.1. Çalışmada Kullanılan Santifüj Ve Spektrofotometre Cihazları.....	13
3.1. İzolatlardan Seçilen 8 Şuştan Bazılarının Gram Boyama Sonucu	
Morfolojik Görüntüsü.....	20
3.2. Chorome Azurol S Agar Deneyi Sonuçları.....	21
3.3. Chorome Azurol S Agar Sonuçları.....	23
3.4. Chrome Azurol S Sıvı Deneyi Solüsyonunun Hazırlanışı	23
3.5. CAS Testi Solüsyonu İle Shuttle Çözeltisinin Karıştırıldığı	
Andaki Renk Değişimi.....	24
3.6. <i>Bacillus Subtilis</i> DY3'ün Zamana Bağlı Siderofor Üretimi.....	25
3.7. <i>Bacillus Subtilis</i> DY5'in Zamana Bağlı Siderofor Üretimi.....	26
3.8. <i>Bacillus Pumilus</i> 44/1'in Zamana Bağlı Siderofor Üretimi.....	26
3.9. <i>Pseudomonas Aeruginosa</i> ' Nın Zamana Bağlı Siderofor Üretimi	27
3.10. <i>Bacillus Subtilis</i> DY3 İçin Sıcaklığın Siderofor Üretimine Etkisi.....	28
3.11. <i>Bacillus Subtilis</i> DY5 İçin Sıcaklığın Siderofor Üretimine Etkisi	28
3.12. <i>Bacillus Pumilus</i> 44/1 İçin Sıcaklığın Siderofor Üretimine Etkisi.....	29
3.13. <i>Bacillus Subtilis</i> DY3 İçin Ph'ın Siderofor Üretimine Etkisi	30
3.14. <i>Bacillus Subtilis</i> DY5 İçin Ph'ın Siderofor Üretimine Etkisi	30
3.15. <i>Bacillus Pumilus</i> 44/1 İçin Ph'ın Siderofor Üretimine Etkisi.....	31

3.16. <i>Bacillus Subtilis</i> DY3 İçin Biyomas Miktarının Siderofor	
Üretimine Etkisi.....	32
3.17. <i>Bacillus Subtilis</i> DY5 İçin Biyomas Miktarının Siderofor	
Üretimine Etkisi.....	33
3.18. <i>Bacillus Pumilus</i> 44/1 İçin Biyomas Miktarının Siderofor	
Üretimine Etkisi	33
3.19. <i>Bacillus Subtilis</i> DY3 İçin Farklı Karbon Kaynaklarının Siderofor	
Üretimine Etkisi	34
3.20. <i>Bacillus Subtilis</i> DY5 İçin Farklı Karbon Kaynaklarının Siderofor	
Üretimine Etkisi	35
3.21. <i>Bacillus Pumilus</i> 44/1 İçin Farklı Karbon Kaynaklarının Siderofor	
Üretimine Etkisi	36
3.22. Farklı Karbon Kaynaklarıyla Hazırlanan Broth Besiyerindeki	
Hücre Büyümesi	36

ÇİZELGELER DİZİNİ

ÇİZELGE

Sayfa

1.1. Çeşitli Bakteri Ve Mantarlar Tarafından Üretilen Siderofor Tipleri.....	4
3.1. Siderofor Üretiminin CAS Ağarda Derecelendirilmesi.....	22



SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ATP	Adenozin trifosfat
Da	Dalton
DNA	Deoksiribonükleik asit
MM9	Minimal Medium 9
OD	Optical Density
Dk	Dakika
rpm	Revolutions Per Minute
μ M	Mikromolar
mM	Milimolar
M	Molar
μ l	Mikrolitre
ml	Mililitre
L	Litre
g	Gram
nm	Nanometre
LB	Luria Broth
s	Saat

1. GİRİŞ

Bakteri yaşamında birçok metal, çeşitli enzimlerin kofaktörü olarak metabolizmaya katılmakta ve organizma yaşamına katkı sağlamaktadır [1]. Bu nedenle metallerin hücre içine alınimleri, bakterilerin yaşamlarını sürdürebilmesi için oldukça önemlidir.

Düşük miktarlarda metal barındıran habitatlardan metal temini önemli olduğundan dolayı bakteriler, özel sistemler geliştirmiştir ve bu sistemlerden biri de siderofor üretim mekanizmasıdır [2, 3, 4].

Yapılan çalışmalara göre sideroforların, çevresel sorunlara yol açan metalleri (Fe^{3+} , Ag^+ , Al^{3+} , Cd^{2+} , Co^{2+} , Cr^{2+} , Cu^{2+} , Eu^{3+} , Ga^{3+} , Hg^{2+} , Mn^{2+} , Ni^{2+} , Pb^{2+} , Sn^{2+} , Tb^{3+} , Tl^+ ve Zn^{2+}) belirli bir oranlarda bağladığı (en yüksek oranda demiri bağladığı) tespit edilmiştir [1, 5, 6].

Sideroforlar (yunanca demir taşıyıcı), düşük moleküller ağırlıklı (400-1500 Da), sıklıkla D aminoasitlerden oluşan organik bileşikler olup biyosentezleri, yetersiz demir seviyesiyle (<5-10 mol/l) tetiklenerek ökaryotik ve prokaryotik organizmalarda hücre bünyesinden salgılanan sekonder metabolitlerdir [2, 7, 3]. Sekonder metabolitler, mikroorganizmalar tarafından gelişme fazının sonunda veya durgun fazda üretilen, bakteri gelişimi ve üremesi için gerekli olmayan ve elverişsiz koşullara karşı bakterilerin kendilerini savunmak için ürettikleri biyomoleküllerdir [8, 9]. Sekonder metabolitlerin sentezi, kromozomal DNA ve nadiren de plazmid DNA'daki genler tarafından kodlanmaktadır. Sekonder metabolitlerin endüstriyel alanda tercih edilmelerinin sebebi; daha kararlı yapıda olmaları, üretim kapasitelerinin yüksekliği ve daha az enerjiye ihtiyaç duymalarıdır [10]. Sideroforlar demir iyonlarına bağlanmadan önce kararlı bir formdadır. Demir iyonları (Fe^{+3}) ile siderofor, demir kompleksi oluşturur. Demir anoksik şartlarda (Fe^{+2}) suda çözünür, oksik şartlarda ise (Fe^{+3}) suda çözünmez. Fe^{+3} formunun düşük çözünürlüğü dolayısıyla organizmalar tarafından demir, kullanılamaz [11, 12, 13]. Mikroorganizmalar, sideroforlar aracılığı ile Fe^{+3} 'ü Fe^{+2} 'ye indirgeyerek demir alınımını sağlar [7].

Hücre dışında bulunan sideroforların tekrar hücre içine alınması için hücre zarında özel reseptörler bulunur. Demir ile kompleks oluşturan sideroforlar, bu reseptörlere bağlanarak aktif taşıma ile hücre içine alınırlar [9, 14].

Bu araştırmada amaç; mikrobiyal kökenli sideroforun yüksek verimlilikle eldesine yönelik olarak tarım topraklarından izole edilen, moleküler tanımlaması yapılmış ve siderofor ürettiği bilinen *Bacillus subtilis* DY3, *Bacillus subtilis* DY5, *Bacillus pumilus* 44/1 baktererilerinde siderofor üretimini etkileyen faktörlerin optimizasyonudur. Optimizasyonda maksimum siderofor üretimi için zaman, sıcaklık, pH, farklı karbon kaynakları ve biyomasa yönelik parametreler araştırılmıştır.

1.1. Siderofor ve Önemi

Biyokatalist olarak demir yerine kobalt ve manganez kullanan *Lactobacillus* sp. cinsi bakteriler hariç, diğer tüm mikroorganizmaların büyüme ve gelişimi için demir zorunlu bir elementtir [15, 16]. Demirin; fotosentez, oksijen salınımı, solunum, nitrat sentezi, azot fiksasyonu, ATP sentezi ve DNA sentezi gibi metabolik reaksiyonlarda ve diğer biyolojik olaylarda birçok mikroorganizma için önemli bir element olduğu bildirilmektedir [13,17,18-19]. Bu nedenle birçok bakteri çevredeki demiri alabilmek için yüksek afiniteli demir kazanım mekanizması olan sideroforu sentezlemektedir [20, 21].

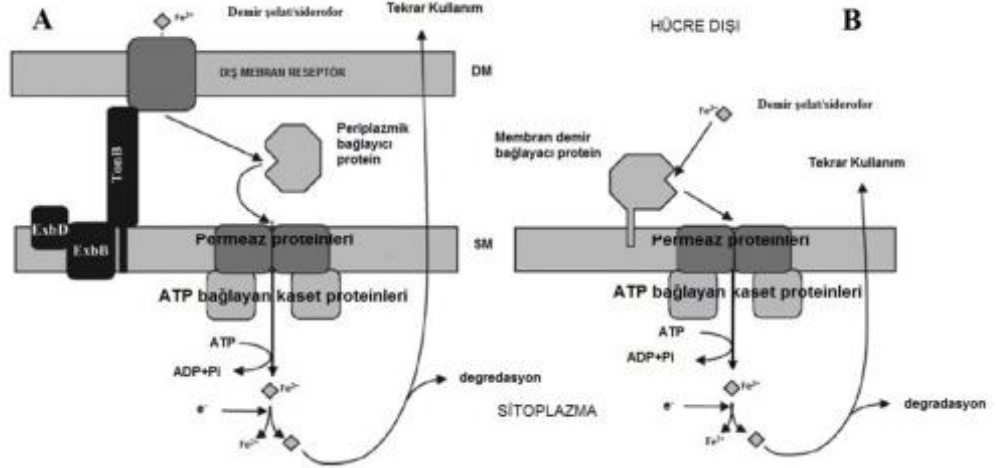
Birçok bakterinin çevredeki demiri alabilmek için farklı yapılardaki sideroforları sentezleyerek birbirleriyle rekabet ettiği bilinmektedir [17, 3]. Mikroorganizmaların ürettiği farklı kimyasal özellikteki sideroforlar çoğunlukla kimyasal kompozisyon ve mikrobiyal orijinlerine göre hidroksamat, katekolat (fenolat), karboksilat (örneğin, sitrik asit türevleri) ve karışık ligantlar olmak üzere dört önemli gruba ayrılmıştır [22, 13]. Birçok enterik bakteri fenolat ve hidroksamat tip sideroforların ikisini birlikte sentezlemektedir (Çizelge 1.1.) [7, 12, 23- 25].

Çizelge 1.1. Çeşitli bakteri ve mantarlar tarafından üretilen siderofor tipleri [22, 26].

Sideroforun Kimyasal tipi	Siderofor	Mikroorganizma
Hidroksammat	Ferrikrom	<i>Ustilago sphaerogena</i>
	Desferrioksamin B	<i>Streptomyces pilosus</i>
	Desferrioksamin E	<i>Streptomyces coelicolor</i>
	Fusarinin C	<i>Fusarium roseum</i>
	Ornibaktin	<i>Burkholderia cepacia</i>
Katekolat	Enterobaktin	<i>Escherichia coli</i>
	Bacillibaktin	<i>Bacillus subtilis</i> <i>Bacillus anthracis</i>
	Vibriobaktin	<i>Vibrio cholerae</i>
Karboksilat	Rhizobaktin	<i>Rhizobium meliloti</i>
	Rhizoferrin	<i>Rhizopus microspores</i>
	Staphyloferrin A	<i>Staphylococcus hyicus</i>
Karışık ligant	Azotobaktin	<i>Azotobacter vinelandii</i>
	Pyoverdin ve pyochelin	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
	Yersiniabaktin	<i>Yersinia pestis</i>
	Maduraferrin	<i>Acinomadura madurae</i>

Bu siderofor tiplerinin sentezi ise iki yolak aracılığıyla gerçekleştirilir: Birincisi NPRS (nonribozomal peptid sentetaz)- bağımlı yolaktır. Burada RNA kalıbına ihtiyaç duyulmadan aminoasitlerden peptitler oluşturulur. NRPS- bağımlı yollar, enterobactin, yersiniabactin, pyochelin, pyoverdin, vibriobactin ve mycobactin tipteki sideroforların üretiminde kullanılmaktadır [27, 28, 29]. İkinci yolak ise NRPS- bağımsız yolaktır. Bu tip yolda da sentez esnasında RNA kalıbı kullanılmaz. Amid ya da ester bağlarıyla bağlanmış, amino-alkol veya diamin yapıtaşları ve dikarboksilik asitler bulunmaktadır [30]. NRPS- bağımsız yollar aerobaktin, alcaligin, stephlobaktin ve petrobaktin gibi hidroksammat ve karboksilat tipteki sideroforların sentezinde kullanılmaktadır [5, 7]. Demir stresi altında bakterilerde sentezlenen bu sideroforlar hücre dışına salgılanır [31, 26]. Hücre dışında demir iyonları (Fe^{+3}) ile karşılaşan sideroforlar buna kuvvetli bir şekilde bağlanır ve ferrisiderofor (siderofor- Fe^{+3}) kompleksi oluşturur. Hücre içinde Fe^{+2} , ye indirgenen demirin hücre içine salınımı bu şekilde kolaylaştırılmış olur [26].

Periplazmaya alınan ferrisiderofor kompleksi burada siderofordan ayrılmakta, oluşan serbest demir, hücre içine alınmakta ve pompa sistemi periplazmik bölgedeki sideroforu tekrar kullanılmak üzere dışsal membrandan pompalamaktadır (Şekil 1.2).



Şekil 1.2. Siderofor aracılığıyla demirin hücre içine taşınması[26].

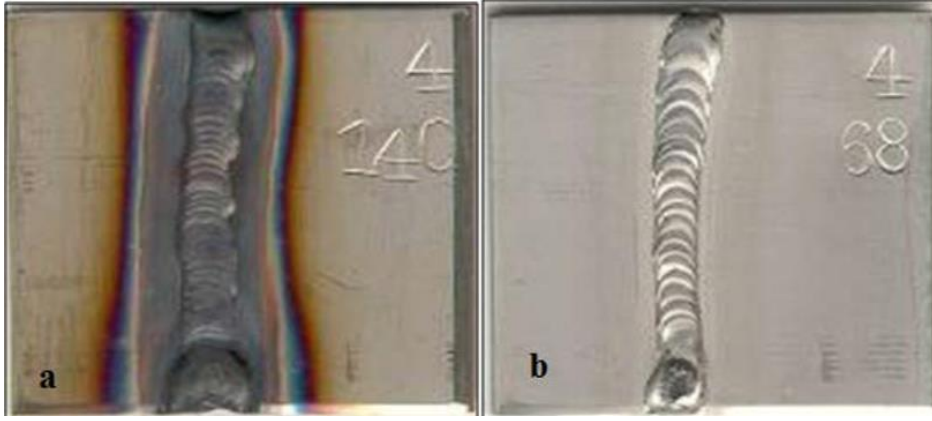
Sideroforlardan kazanılan demir, elektron taşınması, oksijen taşınması ve yaşamsal fonksiyonlarda görevli olan enzimatik faaliyetlerde kullanılmaktadır. Sideroforlar ise patojen mikroorganizmaların yaşamsal faaliyetlerini ve virülans özelliğini arttırıcı etki göstermektedir [32, 33, 34].

1.2. Mikrobiyal Sideroforların Uygulama Alanları

Endüstriyel alanlardaki uygulamalarda mikrobiyal kaynaklı sideroforların ürün bazında kullanımı son yıllarda oldukça popülerlik kazanmıştır [11, 35, 36, 37]. Günümüzde sideroforların malaria, romatoid artrit, alzheimer, talasemi, yaralanma, metal zehirlenmesi, tümör, böbrek yetmezliği gibi hastalıkların tedavisinde taşıyıcı olarak ve patojenlerle mücadelede antibiyotik formda ilaçların geliştirilmesinde kullanıldığı belirtilmektedir [7, 38, 39- 42]. Son yıllarda sideroforların sağlık alanında uygulamalarının artışının en önemli nedenlerinden birisi de antibiyotiklere karşı sürekli artan bakteri direncinin halk sağlığı için büyük tehdit oluşturmalarıdır [43, 44]. Bu durum aynı zamanda sürekli yeni antibiyotik arayışı, mevcut antibiyotiklerin artan kullanımları ve kontrolsüz bir şekilde kötüye kullanılması gibi olumsuz etkilere de neden olmaktadır [45, 46]. Bu amaçla antibiyotiklerin bakteri hücrelerine taşınmasını kolaylaştırmak için çalışmalar yapılmıştır [47-51].

Klinik uygulamaların yanı sıra zirai mücadelede sideroforun bitki köklerinde yer alan bitki patojenlerine ve bitkilerin fitoremediasyonuna yardımcı olduğu araştırmalarla tespit edilmiştir [52 -57].

Sideroforlar çeşitli çevresel sorunların (ağır metal birikimi, pas, boya giderimi ve kanalizasyon sularının temizlenmesi vb.) çözümünde de önemli rol oynamaktadır. Örneğin siderofor üreten bakteriler ağır metallerle kontamine olan çevreden ağır metallerin fitoremediasyonuna yardım etmede kullanılmaktadırlar [58, 26]. Örnek olarak Mannheim Üniversitesi'nde yapılan bir çalışmada bakterilerden elde edilen sideroforların demir içeren sanayi materyalleri üzerine uygulanması sonucunda saflaştırılan sideroforların pas giderimini gerçekleştirdiği ve bu sideroforların diğer pas giderici ajanlara nazaran çevreye karşı daha zararsız olduğu tespit edilmiştir [26] (Şekil 1.3.3.1.).



Şekil 1.3.3.1: Sideroforlar aracılığı ile pas giderimi a) Paslı demir içeren materyal b) Sideroforla muamele sonrası materyaldeki pas giderimi[26].

1.3. Siderofor Üreten Mikroorganizmalar

Son yıllarda sideroforun sentezi, yapıları, özellikleri ve kullanım alanlarına yönelik araştırmalar artmıştır. Bakteri, aktinomiset, mantar ve alglerin farklı tipte siderofor sentezledikleri bildirilmiştir [26, 59]. Aktinomisetlerden *Actinomadura madurae*, *Nocardia asteroides*, *Streptomyces griseus*, mantarlardan *Aspergillus nidulans*, *Penicillium chrysogenum*, *Trametes versicolor*, *Ustilago sphaerogina*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Rhodotorula minuta*, bakterilerden *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Vibrio cholerae*, *Vibrio anguillarum*, *Aerobacter aerogenes*, *Mycobacterium tuberculosis* ve siyanobakterilerden *Anabaena flos-aquae* ile *Anabaena cylindrica* türleri çeşitli tipte sideroforlar üretmektedirler [28, 60-63].

2. MATERYAL VE METOD

2.1. Materyal

2.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Bu çalışmada nutrient broth, nutrient agar, glucose monohydrate D(+), lactose, sodium hydroxide, magnesium chlorid hexanhydrate, potassium dihydrogen phosphate, calcium chloride dihydrate ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), 5-Sulfosalicylic acid dihydrate, HCl, chloroform, ethanol (% 96), Merck firmasından, HDTMA (hexadecyltrimethylammonium), Chrome azurol sulfonate, PIPES (Piperazine diethane sulphonic acid), piperazine, casein sodium salt from bovine milk, ammonium chloride, 8-hdroxyquinolin Sigma firmasından, iron(III) chloride hexanhydrate ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) Horasan Kimya firmasından temin edilmiş ve Türkiye şeker fabrikası atığı melas kullanılmıştır.

Ayrıca bu çalışmada siderofor üretiminin tespitinde aşağıda belirtilen çözeltiler kullanılmıştır.

Minimal Medium 9 (MM9) Tuzu (1 L)

- KH_2PO_4 : 3 g
- NaCl : 5 g
- NH_4Cl : 10 g
- dH_2O ile 1 L' ye tamamlanmıştır.

CAS- HDTMA Solüsyonu (1 L)

- Chrome azurol S : 0,605 g
- dH_2O : 500 ml

İlk olarak CAS distile suyun içinde çözülmüştür.

- $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$: 2,703 g
- HCl : 40 ml
- dH_2O : 100 ml

Distile suyun içinde çözünmüş olan CAS' ın üzerine yukarıdaki karışım eklenmiştir.

- HDTMA : 0,729 g
- dH₂O : 400 ml

Son olarak HDTMA solüsyonu da karışıma eklenmiştir.

Demirsiz Casaminoasit Solüsyonu

- Casaminoasit : 100 g
- dH₂O : 1000 ml
- 8-hydroxquinolin : 30 g
- Chloroform: 1000 ml

Öncelikle Casaminoasit distile suyun içinde çözülmüştür. Ayrı bir kapta 8-hydroxquinolin de kloroform içinde çözülmüştür. İki karışım da ayrı ayrı hazırlandıktan sonra casaminoasit karışımına 8-hydroxquinolin karışımı eklenmiştir. Daha sonra karışımda iki fazdan üstteki faz alınarak aynı oranda kloroformla yeniden muamele yapılmıştır. Bu işlem birkaç defa tekrarlanmıştır.

MgCl₂.6H₂O Çözeltisi (1 M, 100 ml): 20,32 g MgCl₂, dH₂O ile 100 ml' ye tamamlanır.

- CaCl₂.2H₂O Çözeltisi (100 mM , 100 ml): 1,47 g CaCl₂ , d H₂O ile 100 ml' ye tamamlanır.
- Glikoz Çözeltisi (100 ml, 1M): 20 g Glikoz , dH₂O ile 100 ml'ye tamamlanır.
- Laktoz Çözeltisi (100 ml, 1M): 34,23 g Laktoz, dH₂O ile 100 ml' ye tamamlanır.
- Melas Çözeltisi (100 ml, 1M)
- Üzüm Pekmezi Çözeltisi (100 ml 1M)
- Aşağıdaki çözeltiler ve solüsyonlar otoklavlanmadan kullanıma hazır hale getirilmiştir.
- CAS Stok Çözeltisi (1 L, 2mM): 1,21 g CAS dH₂O ile 1 L'ye tamamlanmıştır.
- FeCl₃.6H₂O Çözeltisi (1L, 1mM): 2,703 g FeCl₃.6H₂O , dH₂O ile 1 L'ye tamamlanmıştır.
- HCl Çözeltisi (1 L,10mM): 40 ml HCl'i dH₂O ile 1 L'ye tamamlanmıştır.

- Fe Solüsyonu (1mM)
 - 1 mM FeCl₃.6H₂O : 1000 ml
 - 10 mM HCl : 40 ml
 - HDTMA Çözeltisi (1L): 0.438 g HDTMA dH₂O ile 1 L'ye tamamlanmıştır.
 - Piperazine Tamponu (100 ml, pH 5.6)
 - Piperazine : 5 g
 - dH₂O : 100 ml
- pH 5.6 olana kadar HCl eklenmiştir.
- Shuttle Çözeltisi (100 ml, 0,2M): 2,762 g Sülfosalisilik asit, dH₂O ile 100 ml' ye tamamlanmıştır.
 - CAS Testi Solüsyonu (1 L)
 - Fe Solüsyonu : 15 ml
 - CAS Çözeltisi : 75 ml
 - HDTMA Çözeltisi : 500 ml
 - Piperazin Tamponu : 365.5 ml
 - Distile Su : 44,5 ml

2.1.2. Kullanılan Besiyerleri

Kullanılan tüm besiyerleri 121°C' de 20 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir.

- Nutrient agar
 - Peptone from meat 5,0 g/L
 - Meat extract 3,0 g/L
 - Agar-agar 12,0 g/L
- Nutrient broth
 - Peptone from meat 15,0 g/L
 - Yeast extract 3,0 g/L
 - (D+) glucose 1 g/ L
 - NaCl : 6 g/L
- MM9 Broth (1L pH=7.3)

- dH₂O : 855 ml
- NaOH : 6 g

MM9 broth besiyeri hazırlanırken NaOH distile suyun içinde çözdürülmüş ve daha sonra PIPES eklenmiştir.

- PIPES : 30,24 g
- 10X MM9 tuzu : 100 ml
- 121 °C' de 20 dakika otoklavlanmış ve 50°C' ye kadar soğuması beklenmiş

ve aşağıdaki malzemeler membran filtreden geçirilerek karışıma eklenmiştir.

- Demirsiz casaminoasit : 30 ml
- 1M Glikoz : 10 ml
- 1M MgCl₂ : 1 ml
- 100 Mm CaCl₂ : 1 ml

- MM9 Agar (1 L pH 7.3)

855 ml dH₂O' nun üzerine sırasıyla 6 g NaOH, 30.24 g PIPES, 100 ml 10X MM9 tuzu ve 15 g Bacto-agar eklenmiş ve 121°C' de 20 dakika otoklavlanmıştır. MM9 agar besiyeri hazırlanırken NaOH distile suyun içinde iyice çözülmüş ve daha sonra PIPES eklenmiştir. Böylece NaOH, PİPES'in çözünmesine yardımcı olmuştur. Otoklavdan çıkarılan besi yerinin 50°C' ye kadar soğuması beklenmiş ve sterilitenin bozulmaması için bundan sonraki malzemeler membran filtereden geçirilerek ilave edilmiştir. 50°C'ye kadar soğuyan besi yerine sırasıyla 30 ml demirsiz casaminoasit, 10 ml 1M Glikoz, 1 ml 1M MgCl₂ 1 ml 100 mM CaCl₂ eklenmiş ve pH 7.3 olarak ölçülmüştür.

Siderofor tespiti için iki farklı Chrome Azurol Sulfonate (CAS) agar metodu kullanılmıştır;

a. Chrome Azurol Sulfonate Agar (1L pH= 6.5)

750 ml dH₂O' nun üzerine sırasıyla 6 g NaOH, 30.24 g PIPES, 100 ml 10X MM9 tuzu ve 15 g Bacto-agar eklenmiş ve 121°C' de 20 dakika otoklavlanmıştır. Chorome Azurol S Agar besiyeri hazırlanırken NaOH distile suyun içinde iyice çözülmüş ve daha sonra PIPES eklenmiştir. Böylece NaOH PIPES'in çözünmesine yardımcı olmuştur. Otoklavdan çıkarılan besi yerinin 50°C' ye kadar soğuması beklenmiş ve sterilliğinin bozulmaması için bundan sonraki malzemeler membran filtereden geçirilerek ilave edilmiştir. 50°C'ye kadar suğuyan besi yerine 30 ml Casaminoasit, 100 ml HDTMA, 10 ml %20 Glikoz, 1 ml 1M MgCl₂, 1 ml 100 mM CaCl₂ eklenmiş ve pH 6.5 olarak ölçülmüştür.

b. Schwyn ve Neilands'ın Chrome Azurol Sulfonate Agar Yöntemi

Blue dye : Solüsyon I: 0,06 g CAS'ı 50 ml dH₂O'da çözülmüştür. Solüsyon II: 0,0027 g FeCl₃.6H₂O, 10 ml 10Mm HCl'de çözülmüştür. Solüsyon III: 0,073 g HDTMA'ı 40 ml ddH₂O ' da çözülmüştür. Karışım Solüsyonu: Solüsyon I'i, 9 ml solüsyon II ile karıştırılmış, daha sonra solüsyon III eklenmiş ve çözelti mavi renk olmuştur. Bu karışım otoklavlanmış ve cam şişede saklanmıştır.

Karışım solüsyonu:

- Minimal Media 9 (MM9) tuz stok solüsyonu ; 15 g KH₂PO₄, 25 g NaCl, ve 50 g NH₄Cl'ü 500 ml ddH₂O'da çözülmüştür.
- % 20 Glikoz Stok ; 20 g glikozu 100 ml ddH₂O'da çözülmüştür.
- NaOH Stok ; 25 g NaOH 150 ml ddH₂O' de çözülmüştür. (pH=11-12).
- Casamino Asit Solüsyonu; 3 g Casamino asit 27 ml ddH₂O'da çözülmüştür. Eser demiri çıkarmak için kloroform içinde %3 8-hydroxyquinolin ile ekstrakte edilmiştir. Son olarak karışım filtre edilmiştir.

CAS Agar (1L); 100 ml MM9 stok solüsyonuna, 750 ml ddH₂O eklenmiştir. Daha sonra karışıma 32.24 g piperazine- N,N'-bis (2-ethanesulfonic acid) PIPES eklenmiştir. 15 g bacto agar eklenmiş ve otoklavlanmıştır. 50°C'ye kadar soğuması beklenmiş ve 30 ml steril Casamino asit solüsyonu ve 10 ml % 20' lik glikoz solüsyonu, MM9 ve PIPES karışımına eklenmiştir. Ardından blue dye solüsyonundan 100 ml yavaşça eklenmiştir. Daha sonra karışım steril petrilere dökülmüştür.

Bu çalışmada, Otoklav (Mednif), Manyetik Karıştırıcı (Velp Scientifica), İnkübatör (Labart), Işık mikroskobu (Olympus Cx21), Spektrofotometre (Shimadzu Marka Uv -1201), Hassas Terazı (Sartorius), pH Metre (T-Az 8685 Dijital), Pasteur Fırını (Elektro-Mag), Santrifüj (Hettirh Zentrifugen)(Şekil2.1.3.1), 200µl Mikropipet (Eppendorf Research), 100-1000 µl Mikropipet (Isotherm) ve 0.5 Mcfarland Densitometre (Biosan) cihazları kullanılmıştır.



Şekil 2.1: Çalışmada kullanılan santrifüj ve spektrofotometre cihazları.

2.1.3. Kullanılan Test Bakterileri

Siderofor üretim tespiti için kullanılan test bakterileri, Gazi Eğitim Fakültesi Biyoloji Eğitim A.B.D. Mikrobiyoloji Laboratuvarı koleksiyonunda bulunan 16S rRNA dizilimi ile moleküler tanımlaması yapılmış ve patojen suşlardır. Bu suşlar *Micrococcus yunnanensis* DT1, *Bacillus tequilensis* DT2, *Bacillus invictae* DY1, *Bacillus cereus* DY2, *Bacillus subtilis* DY3, *Cellulosimicrobium sp.* DY4, *Bacillus subtilis* DY5, *Bacillus cereus* DY6, *Bacillus pumilus* 44/1 ve *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027'dir. Bu suşlara ilave olarak *Escherichia coli* KKÜ, Kırıkkale Üniversitesi Bilimsel ve Teknolojik Araştırmalar Merkezi'nden temin edilmiştir.

Tür tayini yapılan suşlar daha sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere % 30'luk gliserollü ependorf tüplerinde – 80°C'de ve yatık agarda +4 °C'de Gazi Eğitim Fakültesi, Biyoloji Eğitim A.B.D. Mikrobiyoloji Laboratuvarı koleksiyonunda saklanmıştır.

2.2. METOD

2.2.1. Test Bakterilerinin Aktifleştirilmesi

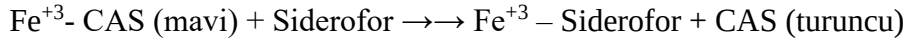
Bu çalışmada kullanılan test bakterileri 5 ml'lik nutrient brothlarda 24 saat inkübasyona bırakılarak 2 kez aktifleştirilmiştir.

2.2.2. Siderofor Üretiminin Tespiti

Bu çalışmaya göre bakterilerin siderofor üretiminin tespiti için 2 farklı Chrome Azurol Sulfonate agar deneyi ve sentezlenen sideroforun miktar tayini için ise Chrome Azurol Sulfonate sıvı deneyleri uygulanmıştır. Bakteri kültürleri tüm deneylerde demir içermeyen MM9 besiyerlerinde üretilmişlerdir. Kullanılan tüm cam malzemeler 180 °C'de 1 saat süreyle pasteur fırınında steril edilmek suretiyle kullanıma hazır hale getirilmiştir.

a. Chrome Azurol Sulfonate Agar Deneyi

Chorome Azurol S agar deneyi, sideroforun ferrik demire yüksek affinitesini temel alan ve siderofor tespitinde kullanılan bir metoddur. CAS agar plateleri ile Fe^{+3} boyasının kompleks oluşturmamasından dolayı mavi renktedir. Siderofor varlığında aşağıda belirtilen reaksiyon gerçekleşir, serbest boya açığa çıkar ve mavi olan renk, turuncuya dönüşür.



Siderofor üretimi için *Bacillus subtilis* DY3, *Bacillus subtilis* DY5, *Bacillus pumilus* 44/1, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 ve *Escherichia coli* KKÜ kültürleri Chorome Azurol S agar besiyerine öze ile tek koloni ekim tekniği ile transfer edilmiştir. Tüm suşlar 37°C'de 336 saat inkübe edilmiştir. Koloni oluşturan bakterilerin oluşturdıkları üreme halkalarının hemen dışında oluşan turuncu renkli zonlar siderofor oluşumunu için pozitif olarak değerlendirilmiştir[64,65].

b. Chrome Azurol S Sıvı Deneyi

CAS sıvı deneyi ile siderofor üretiminin miktar tayini amacıyla *Bacillus subtilis* DY3, *Bacillus subtilis* DY5, *Bacillus pumilus* 44/1, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 ve *Escherichia coli* KKÜ bakterileri demir içermeyen MM9 sıvı besiyerine ön kültüre alınmıştır. Taze MM9 sıvı besiyerine 1/100 oranında aktarılan her bir ön kültür, 37 °C'de 48 saat inkübe edilmiştir. Sideroforlar hücre dışına salgılanan moleküller olduğundan dolayı santrifüj işlemi sonucunda hücreler uzaklaştırılıp süpernatant elde edilmiştir. Bakteri kültürleri inkübasyon sonunda 20°C'de 10.000 rpm'de 5 dk santrifüj edilerek hücre pelletinin çökmesi sağlanmış ve her bir bakteri kültürü için 0,5 ml süpernatant alınarak 0,5 ml CAS solüsyonu ile karıştırılmış, bunu takiben CAS solüsyonu ile siderofor arasındaki bağı kuvvetlendirmesi ve renk değişimini belirginleştirmesi için 10 µM shuttle solüsyonu ilave edilmiştir. Siderofor üretimi olan bakteri türlerinde mavi renkte olan CAS solüsyonu siderofor ile etkileşimi sonucunda turuncu-mor renge dönerek CAS sıvı deneyi için pozitif sonuç vermektedir [64]. Renk değişiminin gerçekleşmesi için en

az 5 dk bekletilip elde edilen sonuçlar fotoğraflanmış ve siderofor üretimi bakteri türleri arasında derecelendirilmiştir.

2.2.3. Üretim Yüzdesinin Belirlenmesi

1/100 oranında demir içermeyen MM9 sıvı besiyerine inoküle edilen bakteri kültürleri 37°C’de 48 saat inkübe edildikten sonra 20 °C’de 10.000 rpm’de 5 dk santrifüj edilerek süpernatant elde edilmiştir. Bu bakteriler tarafından salgılanan sideroforun üretim yüzdesini belirlemek için Payne’ in 1994 yılındaki çalışması esas alınarak 0,5 ml süpernatant, 0,5 ml CAS solüsyonu ile karıştırılmış ve daha sonra 10 µM shuttle solüsyonu (0.2 M sülfosalisilik asit) ilave edilmiştir. Spektrofotometrik ölçüm için kültür içermeyen bir MM9 ortamı, kör olarak kullanılmış, referans (inoküle edilmemiş 0,5 ml MM9 besiyeri + 0,5 ml CAS solüsyonu + 10 µM shuttle solüsyonu) değerlerindeki ve örneklerdeki renk kaybı 630 nm dalga boyunda ölçülerek belirlenmiş ve aşağıdaki formülle hesaplanmıştır.

Sideroforların genel yüzde hesabı;

Ar-As

$$\% \text{ Siderofor} = \frac{\text{Ar-As}}{\text{Ar}} \times 100$$

Ar

Ar: Referans Değeri (A₆₃₀)

As: Örnek Değeri (A₆₃₀)

2.2.4. Maksimum Üretim Zamanının Belirlenmesi

Siderofor üretim zamanını belirlemek amacıyla hazırlanan kültür, 1/100 oranında demir içermeyen MM9 besiyerine inoküle edilerek 37°C’de 96 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon esnasında 0, 4, 8, 12, 16, 20, 24, 48, 72 ve 96. saatlerde alınan örnekler 20 °C’de 10.000 rpm’de 5dk santrifüj edilip hücre pelletinin çökmesi sağlanmıştır. Elde edilen bakteri süpernatantlarından her biri ile CAS sıvı deneyi

yapılmış ve kantitatif veriler elde etmek için 630 nm’de spektrofotometrik ölçümler yapılarak siderefor yüzdeleri belirlenmiştir. Siderofor üretiminin hücre büyümesi ile ilişkisini belirlemek amacı ile belirtilen zaman aralıklarında bakteri kültürleri, Mcfarland densitometre de ölçülmüştür. Deneyler en az 3 kez tekrar edilmiştir.

2.2.5. Siderofor Üretiminin Optimizasyonu

Bu tez çalışmasında *Bacillus subtilis* DY3, *Bacillus subtilis* DY5, *Bacillus pumilus* 44/1, *Pseudomonas aeruginosa* ATTC 9027 ve *Escherichia coli* KKÜ bakterileri tarafından maksimum siderofor üretimine yönelik optimizasyon şartları araştırılmıştır. Bu amaçla sıcaklık, pH, farklı karbon kaynakları, biyomas ve glikoz konsantrasyonunun siderofor üretimine etkisi belirlenmiştir. Tüm deneylerde demir içermeyen MM9 sıvı besiyeri kullanılmıştır.

a. Sıcaklığın Etkisi

Sıcaklık, siderofor üretiminde etkili olan önemli faktörlerden biridir. Sıcaklığın siderofor üretimine etkisini belirleyebilmek amacı ile 1/100 oranında demir içermeyen MM9 sıvı besiyerine inoküle edilen *Bacillus subtilis* DY3, *Bacillus subtilis* DY5, *Bacillus pumilus* 44/1, *Pseudomonas aeruginosa* ATTC 9027 ve *Escherichia coli* KKÜ bakterileri kültürleri 25, 30, 37 ve 40 °C’de 48 s inkübe edilmiştir. Daha sonra bakteri kültürleri alınıp 10.000 rpm’de 5 dk santrifüj edilmiştir. Bakteri kültürlerinden elde edilen süpernatantlardan her biri için CAS sıvı deneyi yapılmış ve siderofor miktarı 630 nm absorbans değerinde ölçülerek bakterilerin siderofor üretim yüzdesi belirlenmiştir. Farklı sıcaklık değerlerinde siderofor üretiminin hücre büyümesi ile ilişkisini belirlemek amacı ile belirtilen zaman aralıklarında bakteri kültürlerinden 1’er ml örnek alınarak 600 nm’de hücre yoğunluk ölçümleri yapılmıştır. Deneyler en az 3 kez tekrar edilmiştir.

b. pH 'ın Etkisi

pH'ın siderofor üretimine etkisini belirlemek amacı ile pH 5.2, 6.0 ,7.3 ,8.0 ve 10.0 olmak üzere 5 farklı pH değerine sahip MM9 sıvı besiyeri hazırlanmıştır. *Bacillus subtilis* DY3, *Bacillus subtilis* DY5, *Bacillus pumilus* 44/1, *Pseudomonas aeruginosa* ATTC 9027 ve *Escherichia coli* KKÜ bakterileri 1/100 oranında farklı pH' lardaki demir içermeyen taze MM9 broth besi yerlerine inoküle edilmiştir. 37°C'de 48 saat inkübasyonun ardından hücreler 10.000 rpm'de 5 dk santrifüj edilmiştir. MM9 besiyerine salgılanan siderofor miktarını belirlemek amacıyla elde edilen süpernatantlardan her birine CAS sıvı deneyi yapılmış ve siderofor birim yüzdesi spektrofotometrede 630 nm'de ölçülerek belirlenmiştir. Farklı pH'larda siderofor üretiminin hücre büyümesi ile ilişkisini belirlemek amacı ile belirtilen zaman aralıklarında bakteri kültürlerinden 1'er ml örnek alınarak 600 nm'de hücre yoğunluk ölçümleri yapılmıştır. Deneyler en az 3 kez tekrar edilmiştir.

c. Farklı Karbon Kaynaklarının Etkisi

Farklı karbon kaynaklarının siderofor üretimine etkisini inceleyebilmek amacı ile 1 M'lık glikoz, laktoz, melas, üzüm pekmezi içeren 4 farklı MM9 broth besiyeri ortamı hazırlanmıştır. Bunun yanında 2 farklı glikoz konsantrasyonu kullanılmış ve bakteriler demir içermeyen MM9 sıvı besiyerlerine 1/100 oranında inoküle edilmiştir. Bakteri kültürleri 37° C'de 48 saat inkübe edildikten sonra 10.000 rpm'de 5 dk santrifüj edilip süpernatant elde edilmiştir. CAS sıvı deneyi sonucu örneklerde oluşan renk değişimi spektrofotometrede 630 nm'de ölçülerek belirlenmiş ve elde edilen veriler kullanılarak bakterilerin siderofor üretim yüzdesi hesaplanmıştır. Farklı karbon kaynaklarının hücre büyümesi ile ilişkisini belirlemek amacı ile belirtilen zaman aralıklarında bakteri kültürlerinden 1'er ml örnek alınarak 600 nm'de hücre yoğunluk ölçümleri yapılmıştır. Deneyler en az 3 kez tekrar edilmiştir.

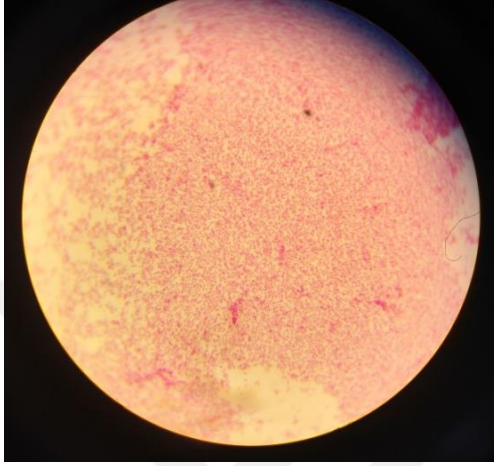
d. Biyomasın Etkisi

Biyomas miktarının siderofor üretimi üzerindeki etkisini incelemek amacı ile *Bacillus subtilis* DY3, *Bacillus subtilis* DY5, *Bacillus pumilus* 44/1 bakterisi 0.5, 1.0, 1.5, 3.0, 5.0/100 oranlarında demir içermeyen MM9 besiyerlerine inoküle edilmişlerdir. Bunu takiben bakteri kültürleri 37°C’de 48 saat inkübe edildikten sonra 10.000 rpm’de 5 dk santrifüj edilip hücre pelletinin çökmesi sağlanmıştır. Bakteri kültürlerinden elde edilen süpernatantlardan her biri ile CAS sıvı deneyi yapılmış ve siderofor miktarı 630 nm’de ölçülerek bakterilerin siderofor üretim yüzdeleri belirlenmiştir. Farklı inokülasyon miktarlarının hücre büyümesi ile ilişkisini belirlemek amacı ile belirtilen zaman aralıklarında bakteri kültürlerinden 1’er ml örnek alınarak 600 nm’de hücre yoğunluk ölçümleri yapılmıştır. Deneyler en az 3 kez tekrar edilmiştir.

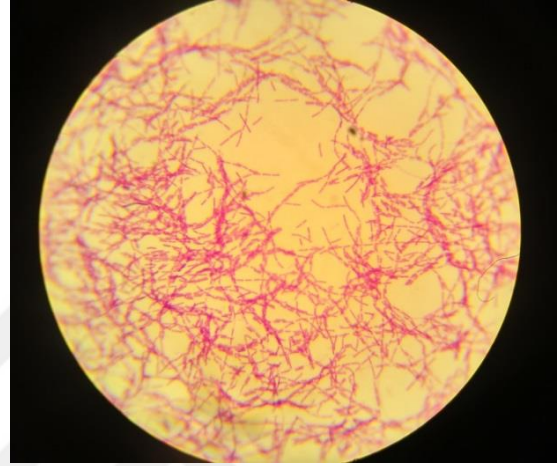
3. ARAŞTIRMA BULGULARI

3.1. Kullanılan Test Bakterileri:

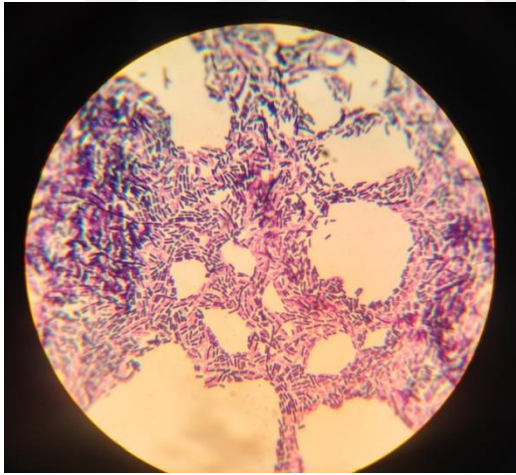
Aktifleştirme yapılan bakterileri kontrol etmek amacıyla yapılan gram boyama sonuçlarına göre morfolojik görüntüler Şekil 3.1’de gösterilmiştir.



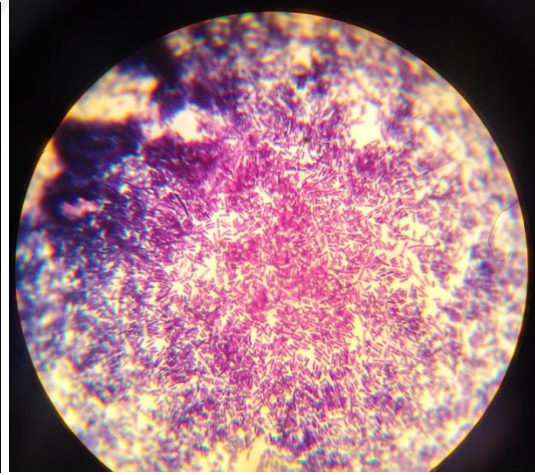
Micrococcus yunnanensis DT1



Bacillus tequilensis DT2



Bacillus cereus DY2

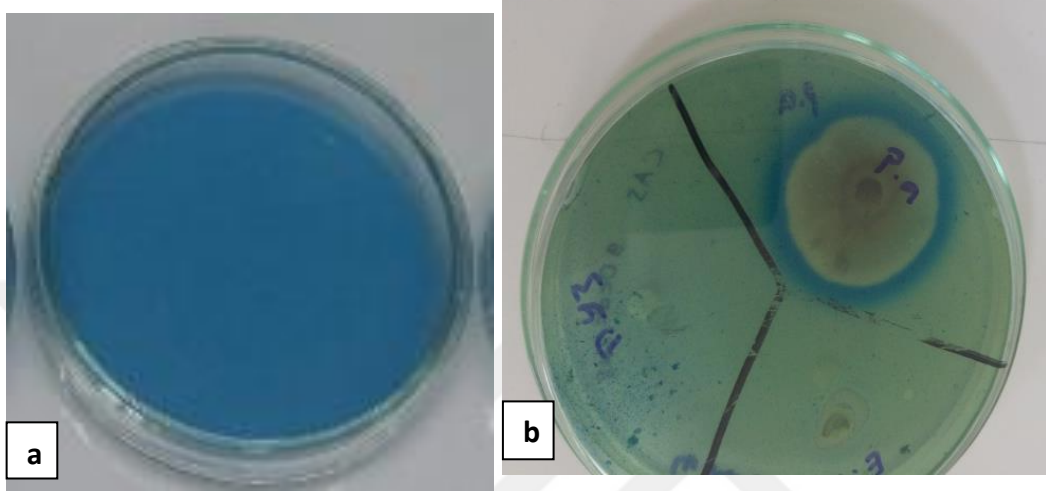


Bacillus cereus DY6

Şekil 3.1 : İzolatlardan seçilen 8 şuştan bazılarının gram boyama sonucu morfolojik görüntüsü.

3.2. Siderofor Tespiti

336 saat inkübasyona bırakılan izolatların siderofor üretimine bağlı olarak bakteri kolonilerinin etrafında oluşan turuncu renkli zonlar Şekil 3.2’de gösterilmiştir.



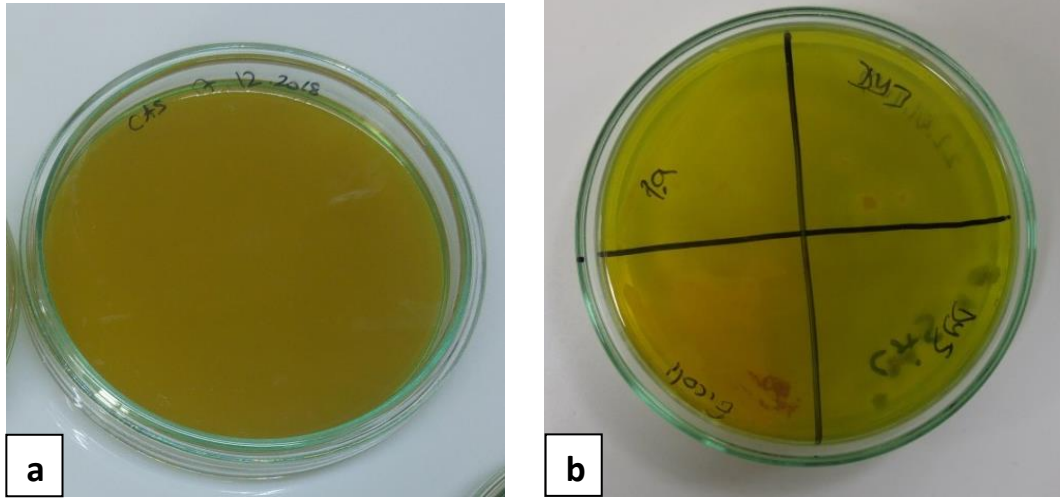
Şekil 3.2. Chorome Azurol S agar deneyi sonuçları **a)** Kontrol **b)** *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 , *Escherichia coli* KKÜ, *Bacillus subtilis* DY3 bakterilerinin ekimi ve *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027’ de siderofor üretiminin görüldüğü pozitif sonuç

Elde ettiğimiz sonuçlara göre deneyde kullanılan tüm suşlarda siderofor üretimi gözlenmiştir. Siderofor üretimini kendi aralarında derecelendirdiğimizde en yüksek siderofor üretimi, pozitif kontrol olan *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 bakterisinde, en az siderofor üretimi ise *Bacillus invictae* DY1 bakterisinde gözlenmiştir. CAS agar plaklarda yapılan ekimler 2-7 gün içerisinde sonuç vermiştir. Ekim yapıldıktan sonra yapılan ölçümlere göre siderofor üretimi Çizelge 3.1’de gösterilmiştir.

Çizelge 3.1. Siderofor üretiminin CAS agarda derecelendirilmesi

Bakteri Türleri	CAS Agar
<i>Bacillus subtilis</i> DY3	++
<i>Bacillus subtilis</i> DY5	++
<i>Bacillus cereus</i> DY6	+
<i>Escherichia coli</i> KKÜ	++
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATTC 9027	+++
<i>Bacillus pumilus</i> 44/1	++
<i>Micrococcus yunnanensis</i> DT1	+
<i>Bacillus tequilensis</i> DT2	+
<i>Bacillus invictae</i> DY1	+
<i>Bacillus cereus</i> DY2	+
<i>Cellulosimicrobium</i> sp. DY4	+
(-): siderofor üretimi yok, (+) az siderofor üretimi, (++) orta derecede siderofor üretimi, (+++) yüksek siderofor üretimi.	

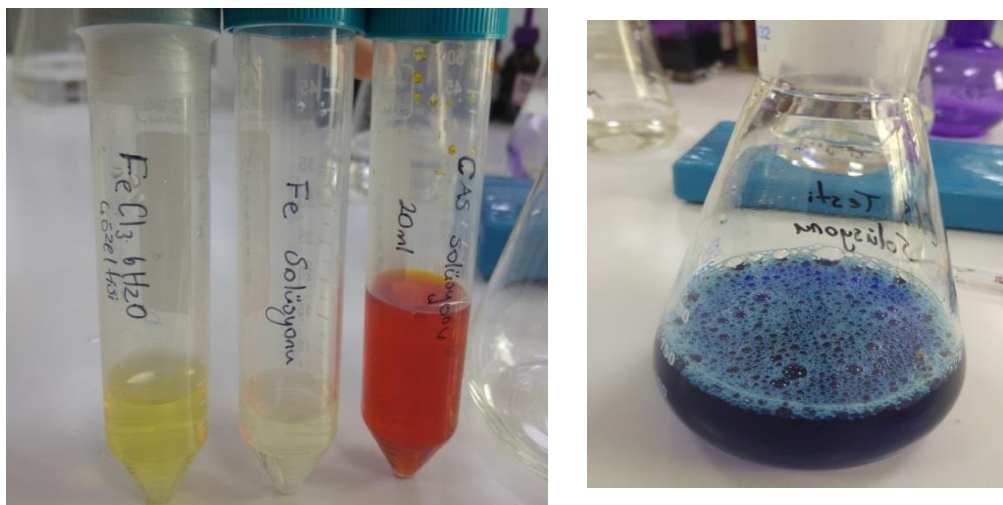
Schwyn ve Neilands'ın metodu ile yapılan CAS agar deneyi sonuçları Şekil 3.3'de gösterilmiştir. Buna göre PIPES, pH 5.0'in altında çözünmezdir. Solüsyona PIPES eklenerek pH'ı 6.8'ye getirilir. pH 6.8'i aştığında solüsyonun rengi yeşile dönmektedir. Burada yaptığımız deney sonucunda pH 6.8'den fazla olmuştur ve CAS agarın rengi yeşile dönmektedir. Bu plaklarda turuncu ve açık sarı zonlar, siderofor varlığını göstermektedir (Şekil 3.3).



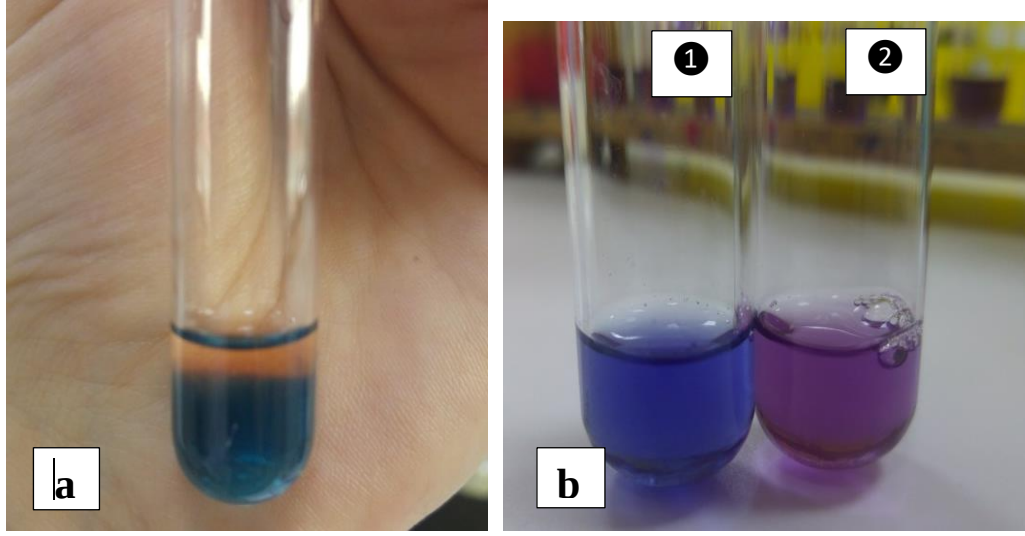
Şekil 3.3. CAS agar sonuçları. a) Kontrol b) *Bacillus subtilis* DY3, *Bacillus subtilis* DY5, *Escherichia coli* KKÜ, *Pseudomonas aeruginosa* ATTC 9027 ekimi yapılmış CAS agar plakları. *Escherichia coli* KKÜ'de siderofor üretimi pozitif sonuç vermiştir.

3.3. Chrome Azurol S Sıvı Deneyi

Bakteri kültürlerinin sıvı besiyerine salgıladıkları sideroforun kantitatif tespiti için Chrome Azurol S sıvı deneyi yapılmıştır. CAS solüsyonun yapılışı Şekil 3.4’de, elde ettiğimiz sonuçlar ise Şekil 3.5’ de gösterilmiştir.



Şekil 3.4. Chrome Azurol S sıvı deneyi solüsyonunun hazırlanışı



Şekil 3.5. a) CAS testi solüsyonu ile shuttle çözeltilisinin karıştırıldığı andaki renk değişimi. **b) 1)** Kontrol. **2)** *Bacillus pumilus* 44/ 1' in CAS sıvı deneyi sonucu siderofor üretimi.

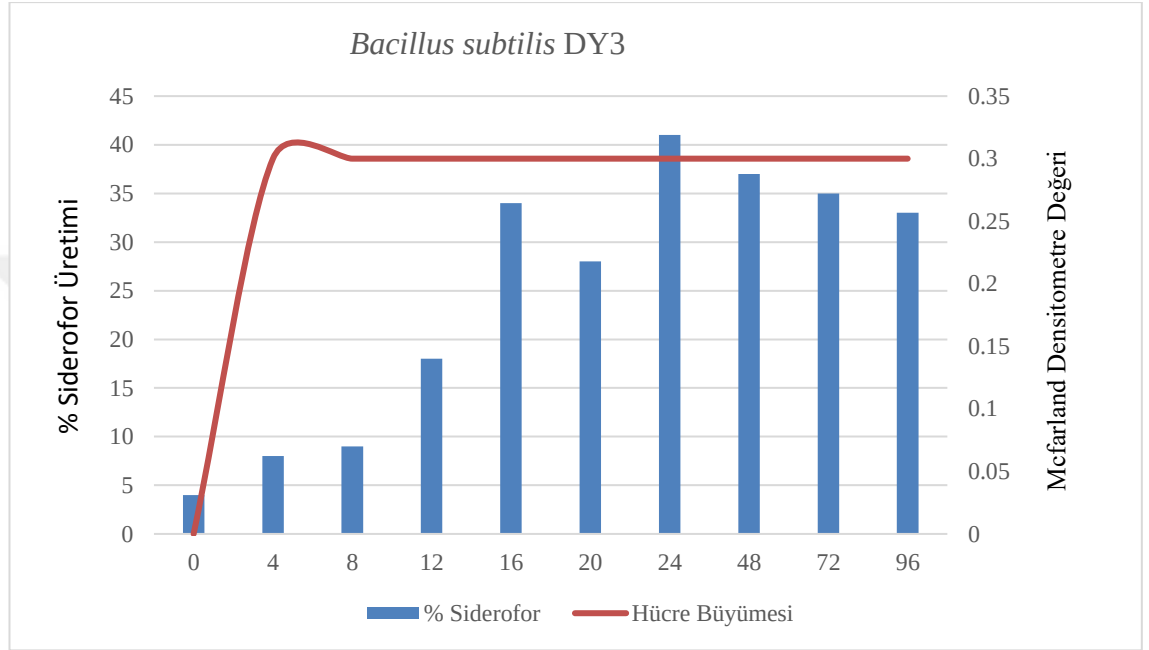
Bu sonuçlara göre, *Bacillus subtilis* DY3, *Bacillus subtilis* DY5, *Bacillus pumilus* 44/1 bakterilerinde CAS solüsyonunun mavi olan rengi, mora dönüşmüştür.

3.4. Siderofor Üretim Yüzdeleri

Siderofor üretim miktarını belirlemek amacıyla CAS sıvı deneyi yapılmıştır. Buna bağlı olarak CAS rengindeki değişim oranı 630 nm dalga boyunda ölçülmüş ve siderofor birim yüzdesi hesaplanmıştır. Elde ettiğimiz verilere göre siderofor üretimi yüzdesi, *Bacillus subtilis* DY3'de % 41 *Bacillus subtilis* DY5'de % 53, *Bacillus pumilus* 44/1'de % 43 olarak belirlenmiştir (optimizasyon öncesi).

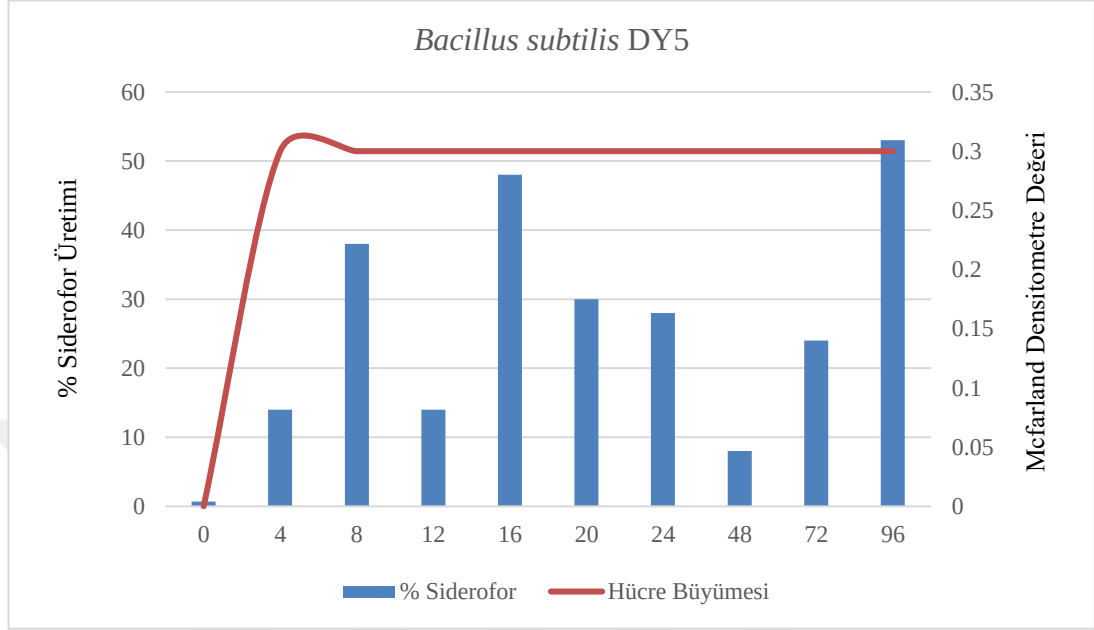
3.5. Maksimum Siderofor Üretim Zamanı

İnkübasyon süresinin siderofor üretimine etkisini belirlemek amacıyla yaptığımız deney sonucunda en yüksek siderofor üretimi *Bacillus subtilis* DY3 suşu için, 24. saatte % 41 olarak tespit edilmiştir (Şekil 3.6)



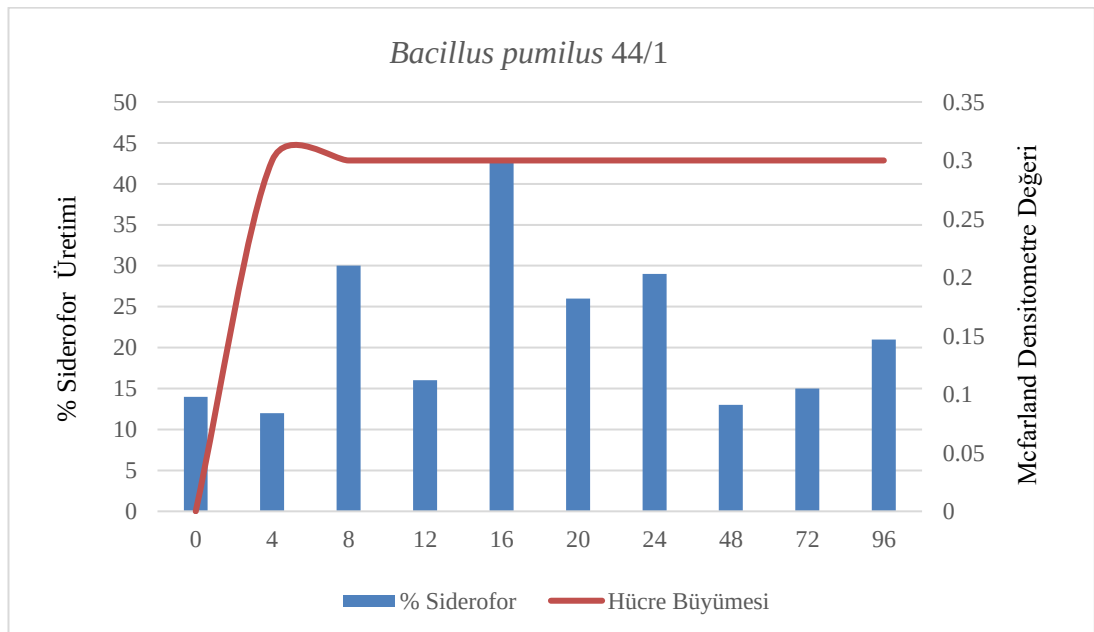
Şekil 3.6. *Bacillus subtilis* DY3'ün zamana bağlı siderofor üretimi.

En yüksek siderefor üretimi *Bacillus subtilis* DY5 suşu için 96. saatte % 53 olarak tespit edilmiştir (Şekil 3.7).



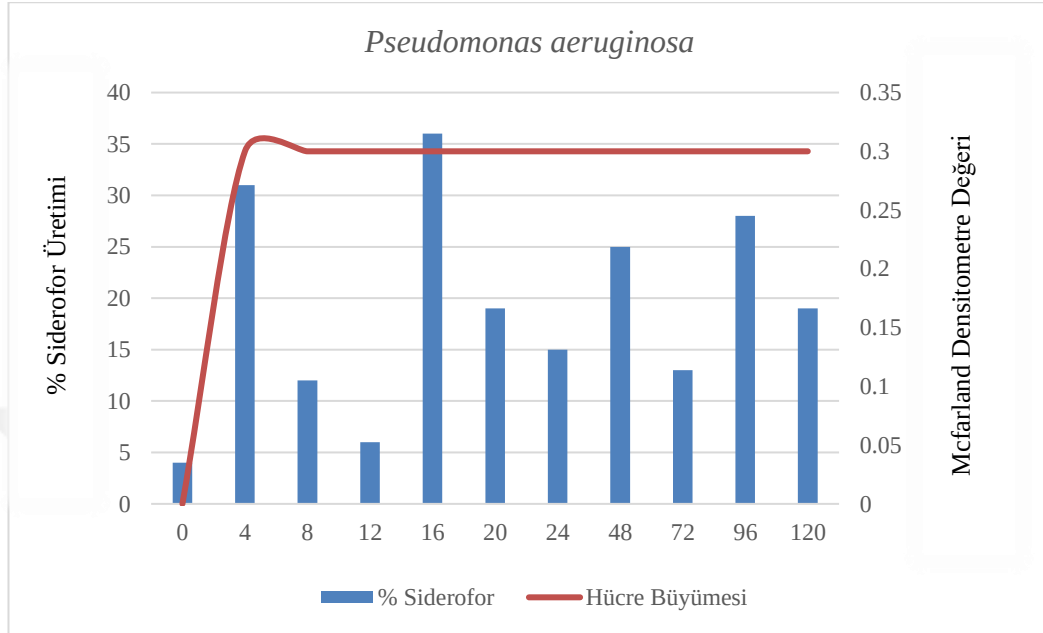
Şekil 3.7. *Bacillus subtilis* DY5'in zamana bağlı siderefor üretimi

En yüksek siderefor üretimi *Bacillus pumilus* 44/1 suşu için 16. saatte % 43 olarak tespit edilmiştir (Şekil 3.8).



Şekil 3.8. *Bacillus pumilus* 44/1'in zamana bağlı siderofor üretimi

En yüksek siderofor üretimi *Pseudomonas aeruginosa* suşu için 16. saatte %36 olarak tespit edilmiştir (Şekil 3.9).



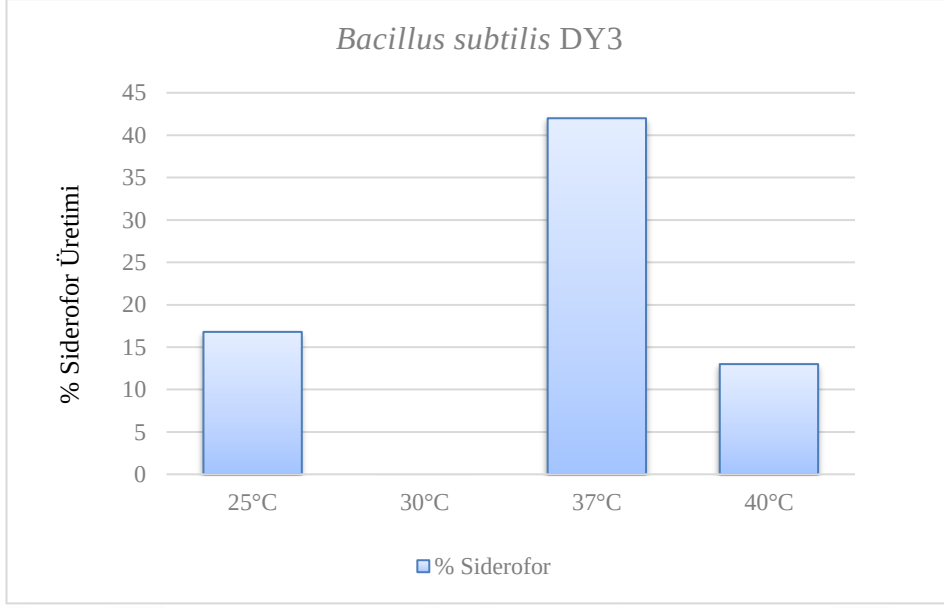
Şekil 3.9. *Pseudomonas aeruginosa*'nın zamana bağlı siderofor üretimi

3.6. Siderofor Üretiminin Optimizasyonu

3.6.1. Sıcaklığın Etkisi

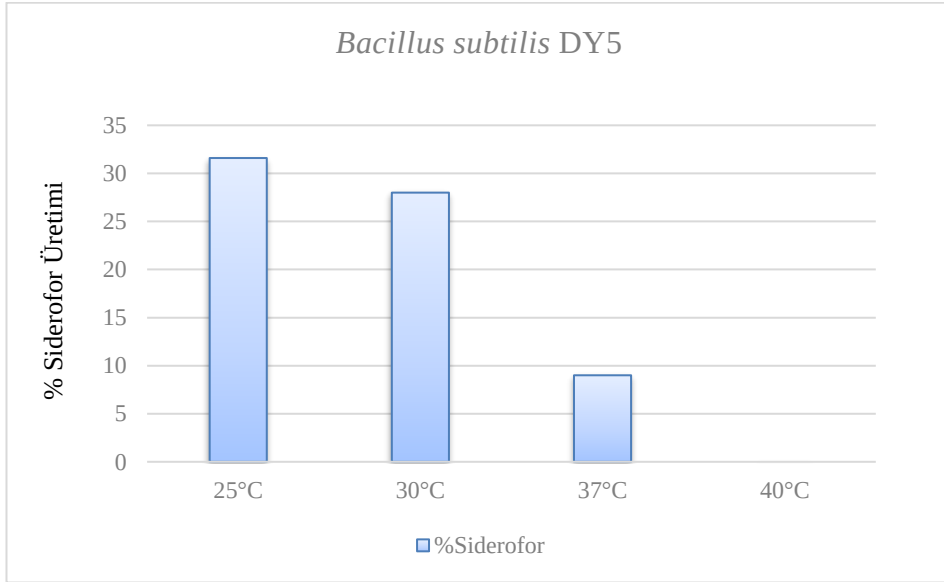
Sıcaklığın siderofor üretimine etkisini belirlemek amacıyla yaptığımız deneyde, *Bacillus* türleri için büyüme sıcaklığının 30-37°C'de olduğu bilinmektedir ve sıcaklık değerleri buna göre seçilmiştir.

Bacillus subtilis DY3 suşu için en yüksek siderofor üretiminin gözlemlendiği sıcaklık değeri 37°C olarak tespit edilmiş ve siderofor üretimi 24. saatte % 42 olarak ölçülmüştür (Şekil 3.10).



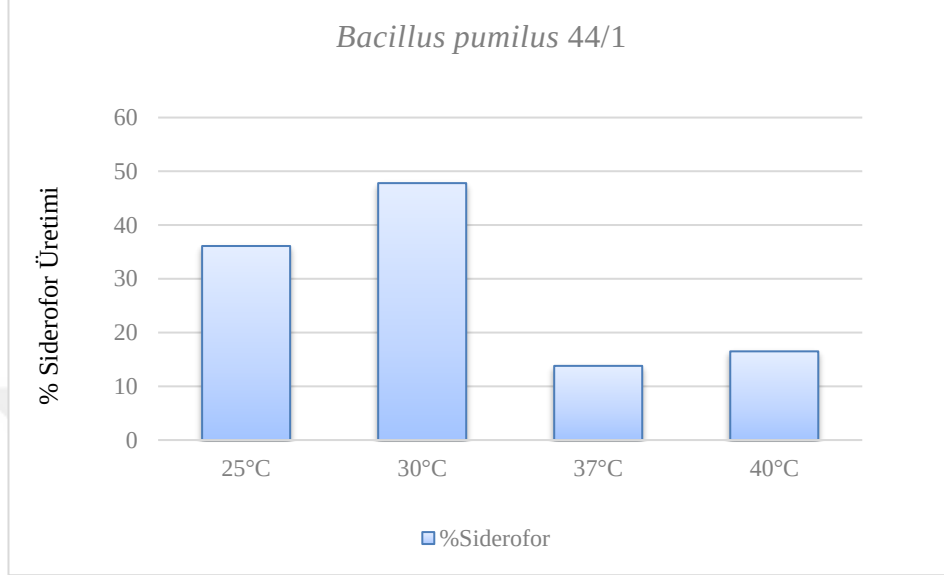
Şekil 3.10. *Bacillus subtilis* DY3 için sıcaklığın siderofor üretimine etkisi

Bacillus subtilis DY5 suşu için en yüksek siderofor üretiminin gözlemlendiği sıcaklık değeri 25°C olarak tespit edilmiş ve siderofor üretimi 48. saatte %31,6 olarak ölçülmüştür (Şekil 3.11).



Şekil 3.11. *Bacillus subtilis* DY5 için sıcaklığın siderofor üretimine etkisi

Bacillus pumilus 44/1 suşu için en yüksek siderofor üretiminin gözlemlendiği sıcaklık değeri 30°C olarak tespit edilmiş ve siderofor üretimi 48. saatte % 47,8 olarak ölçülmüştür (Şekil 3.12).

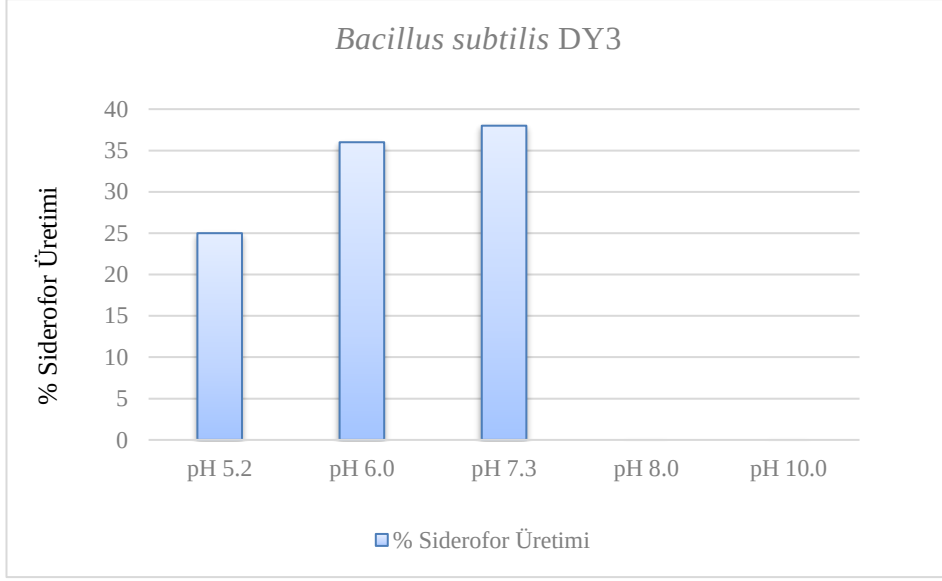


Şekil 3.12. *Bacillus pumilus* 44/1 için sıcaklığın siderofor üretimine etkisi

3.6.2. pH' ın Etkisi

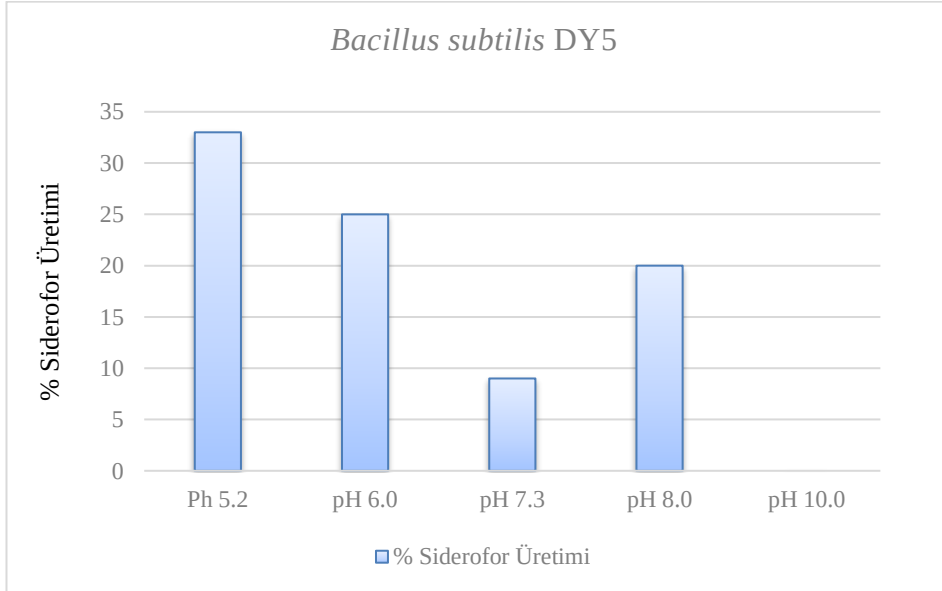
Bakterilerin besi ortamındaki demirin çözünürlüğü, pH tarafından etkilenmektedir. Farklı pH'larda MM9 broth besi ortamı hazırlanırken pH 5.2'den daha düşük bir pH değerine inilememiştir. Bunun nedeni MM9 ortamı hazırlarken, NaOH içinde çözünen PİPES'in pH 5.2'den daha düşük pH değerlerinde çözünememesidir, bunun sonucunda en düşük pH değeri 5.2 olarak belirlenmiştir.

Bu çalışmada, *Bacillus subtilis* DY3 için en yüksek hücre büyümesi siderofor üretiminin az olduğu (%25) pH 5.2'de gözlenirken maksimum siderofor üretimi ise %38 olarak büyümenin azaldığı pH 7.3'de gözlenmiştir (Şekil 3.13).



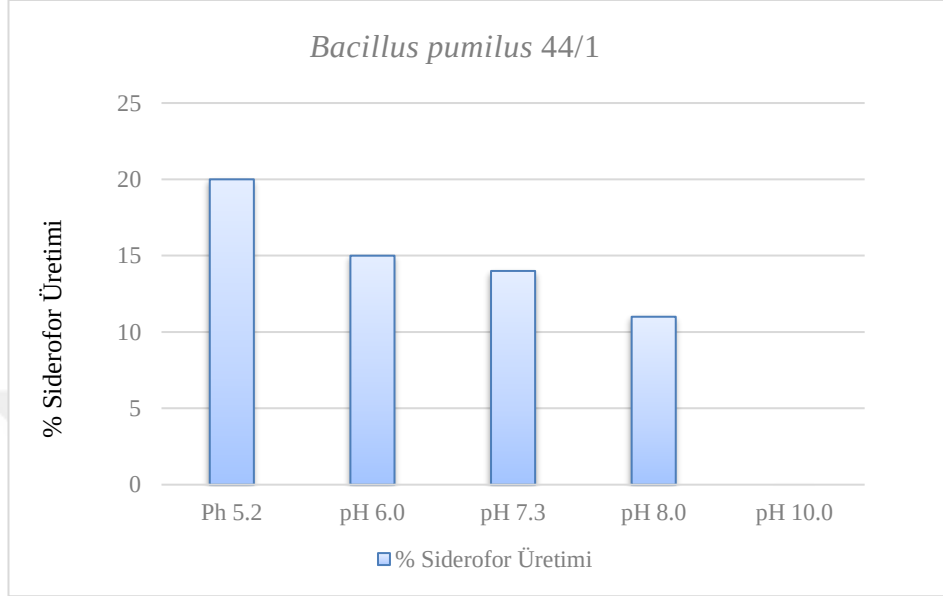
Şekil 3.13. *Bacillus subtilis* DY3 için pH'ın siderofor üretimine etkisi

Bacillus subtilis DY5 için en yüksek hücre büyümesi siderofor üretiminin az olduğu (% 25) pH 6.0'da gözlenirken maksimum siderofor üretimi ise % 33 olarak büyümeni azaldığı pH 5.2'de gözlenmiştir (Şekil 3.14).



Şekil 3.14. *Bacillus subtilis* DY5 için pH'ın siderofor üretimine etkisi

Bacillus pumilus 44/1 için en yüksek hücre büyümesi siderefor üretiminin az olduğu (%11) pH 8.0’da gözlenirken maksimum siderefor üretimi ise %20 olarak büyümenin azaldığı pH 5.2’de gözlenmiştir (Şekil 3.15).



Şekil 3.15. *Bacillus pumilus* 44/1 için pH’ın siderefor üretimine etkisi

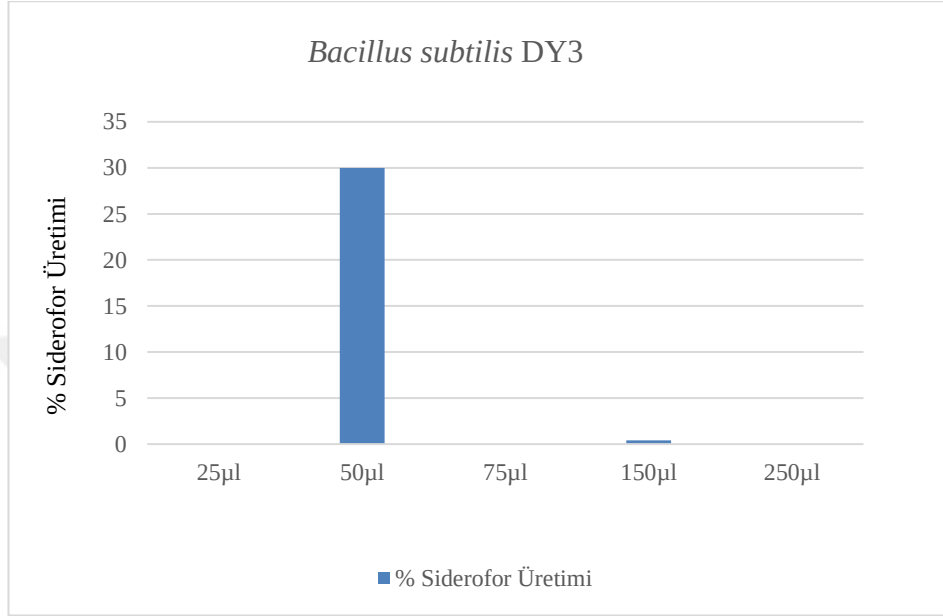
3.6.3. Biyomasın Etkisi

Biyomas büyüklüğünün siderefor üretimine etkisini belirlemek için Mcfarland densitometre değeri 4.0, hücre yoğunluğu 1×10^6 olan stok çözeltiden demir içermeyen 5’er ml MM9 besi ortamlarına farklı inokülasyon miktarlarında (% 0.5, 1.0, 1.5, 3.0, 5.0) inoküle edilmiş suşlar 37 °C’de 48 saat inkübe edilmiştir.

Büyüme oranları ve siderefor ölçümü, daha önce açıklandığı şekilde yapılmıştır.

Biyomas miktarı % 0.5–1.5 arasında hücre büyümeleri arasındaki farkın çok olmamasına rağmen biyomas miktarı %5’den alınan örneklerle göre hücre büyümesinde azalma gözlenmiştir.

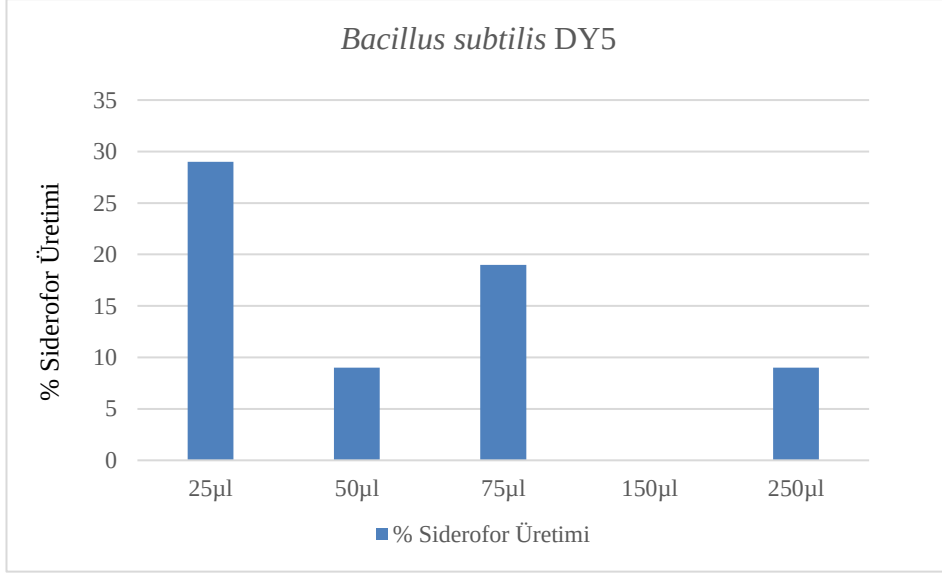
Buna göre *Bacillus subtilis* DY3 için biyomas miktarı % 0.5-1.5 arasında, hücre büyümesinde artış gözlenirken % 1,5'den sonraki inokulasyon değerlerinde hücre büyümesinde azalma gözlenmiş ve en yüksek siderofor üretimi (%38) 1/100 oranında inokülasyon miktarında tespit edilmiştir (Şekil 3.16).



Şekil 3.16. *Bacillus subtilis* DY3 için biyomas miktarının siderofor üretimine etkisi

*Stok çözelti 1×10^6 cfu/ml

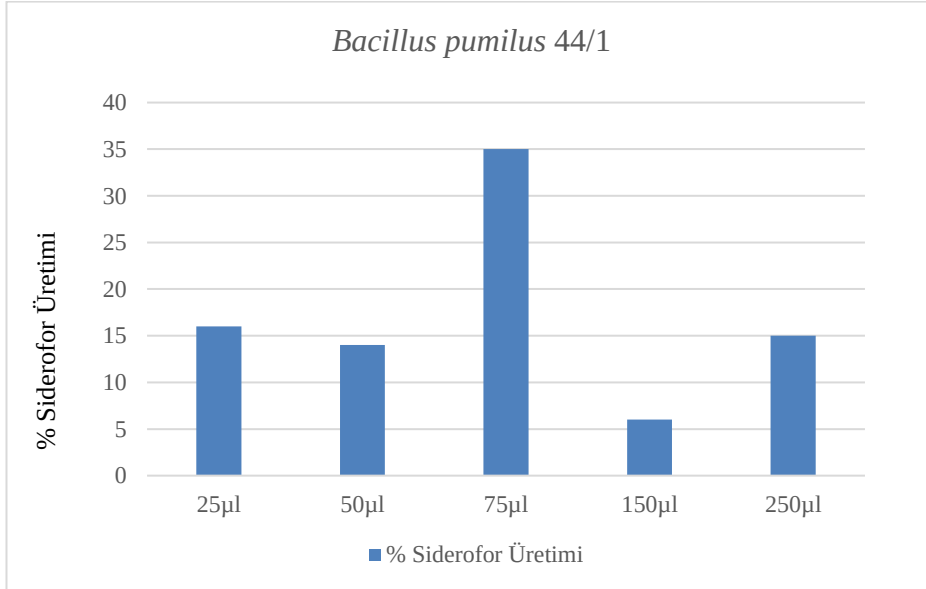
Bacillus subtilis DY5 bakterisi inokülasyon miktarı % 0.5-3.0 arasında hücre büyümesinde artış gösterirken %3'den sonraki biyomas değerlerinde hücre büyümesinde azalma göstermiş ve en yüksek siderofor üretimi (% 29) 0.5/100 oranında inokülasyon miktarında gözlenmiştir (Şekil 3. 17).



Şekil 3.17. *Bacillus subtilis* DY5 için biyomas miktarının siderofor üretimine etkisi

*Stok çözelti 1×10^6 cfu/ml

Bacillus pumilus 44/1 bakterisi inokülasyon miktarı % 0.5-1.5 arasında hücre büyümesinde artış gösterirken % 1.5’den sonraki inokülasyon değerlerinde hücre büyümesinde azalma göstermiş ve en yüksek siderofor üretimi (% 35) 1.5/100 oranında inokülasyon miktarında gözlenmiştir (Şekil 3.18).



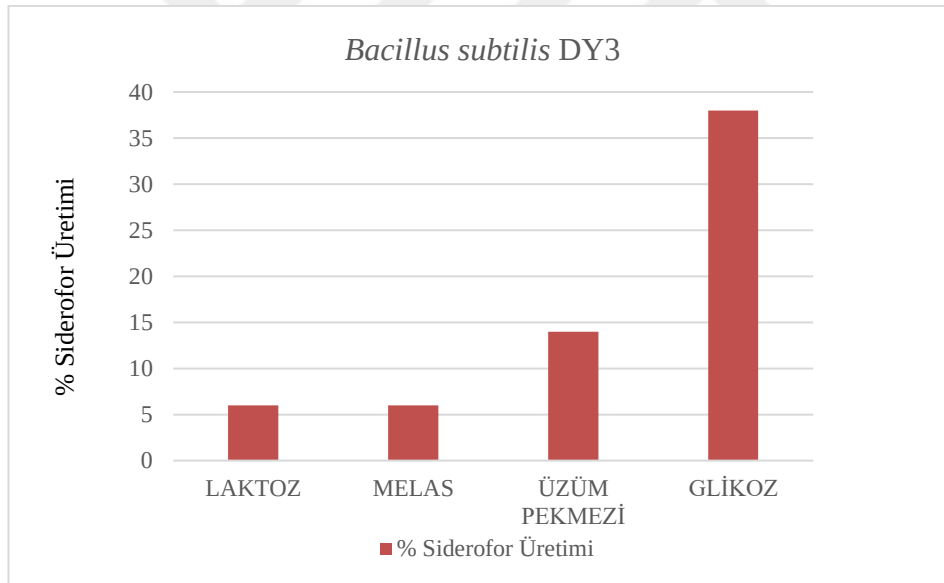
Şekil 3.18. *Bacillus pumilus* 44/1 için biyomas miktarının siderofor üretimine etkisi

*Stok çözelti 1×10^6 cfu/ml

3.6.4. Karbon Kaynaklarının Etkisi

Basit şekerler bakterilerin büyümesini hızlandırmakta ve dolayısıyla siderofor gibi sekonder metabolitlerin üretimini arttırmaktadır. Bu amaçla, son konsantrasyonu 1 M olacak şekilde ayrı ayrı ilave edilmiş (glikoz, laktoz, melas, üzüm pekmezi) içeren, demir içermeyen 4 farklı MM9 besiyeri hazırlanmıştır. Her bir besiyeri (pH 7.3) 37°C’de 48 saat inkübe edilmiş ve siderofor ölçümü daha önce belirtildiği şekilde yapılmıştır.

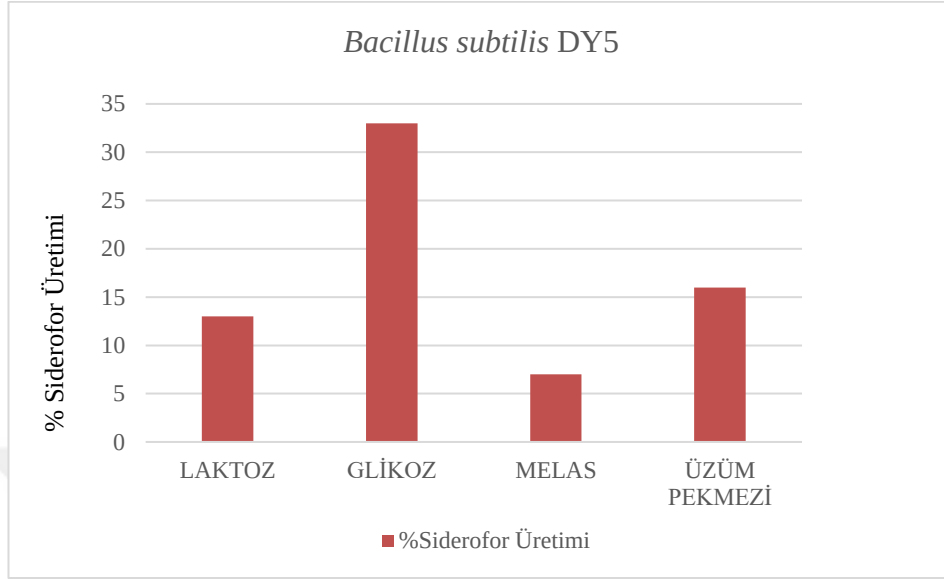
Bacillus subtilis DY3 izolatının melaslı ölçümlerine göre; *Bacillus subtilis* DY3’te 24. saate kadar hızlı bir hücre büyümesi gerçekleşirken 24. saatten 48. saate doğru hücre büyümesinde azalma olmuştur. Buna karşın siderofor üretimi ise 24. saatten sonra sabit devam etmiştir. En yüksek siderofor üretimi %38 glikoz varlığında tespit edilmiştir (Şekil 3.19).



Şekil 3.19. *Bacillus subtilis* DY3 için farklı karbon kaynaklarının siderofor üretimine etkisi

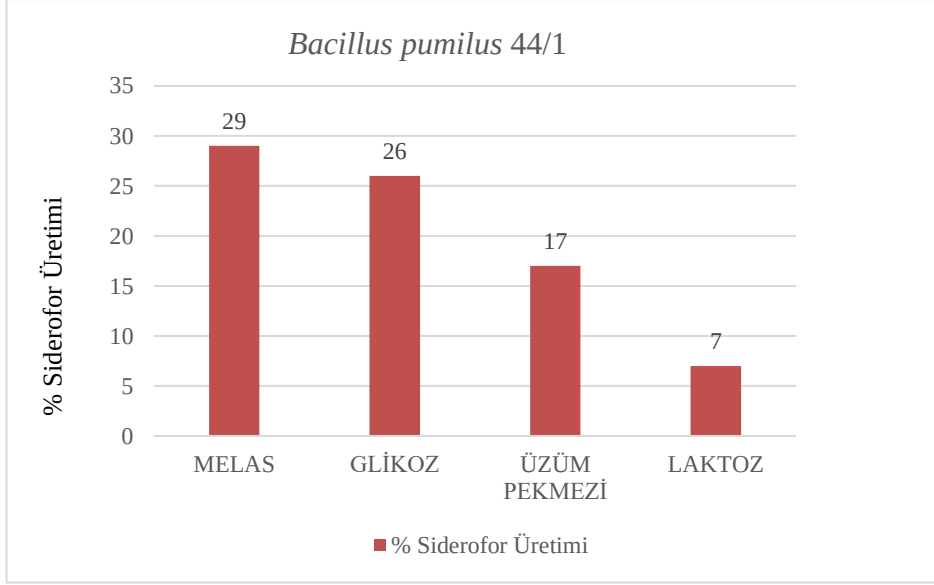
Melas varlığında *Bacillus subtilis* DY5 izolatının ilk 24 saatte hücre büyümesi hızlı bir şekilde sürerken 24. saatten sonra hücre büyümesi daha yavaş bir şekilde devam etmektedir, buna karşın 24. saatten sonra siderofor üretiminde azalma

gözlenmiştir. En yüksek siderofor üretimi %33 glikoz varlığında tespit edilmiştir (Şekil 3.20).



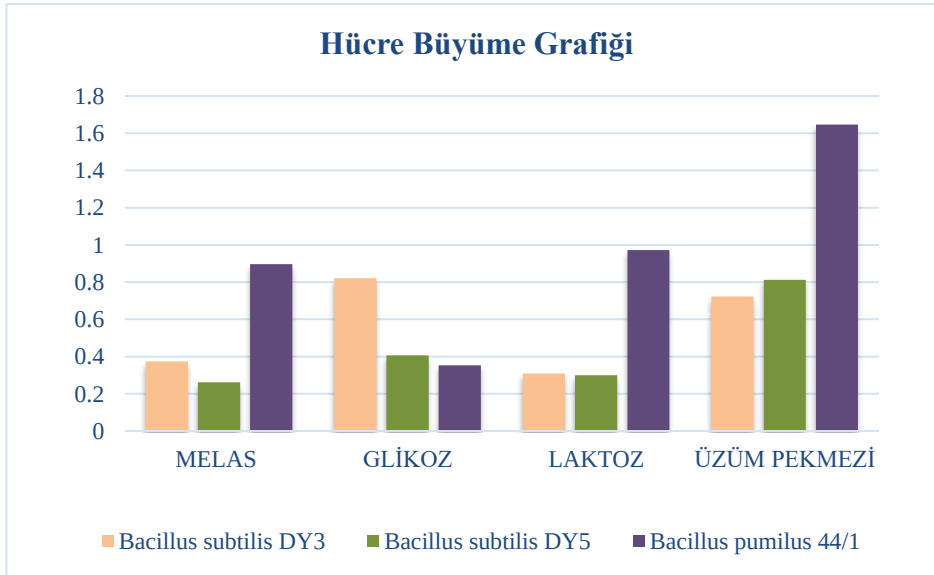
Şekil 3.20. *Bacillus subtilis* DY5 için farklı karbon kaynaklarının siderofor üretimine etkisi

Melas varlığında *Bacillus pumilus* 44/1 izolatının hücre büyümesi 48. saate doğru yüksek oranda artarken siderofor üretimi de 2 katına çıkmıştır. En yüksek siderofor üretimi 24. saatte %24 glikoz varlığında gözlenmiş, 48. saatte ise melas varlığında % 29 olarak bulunmuştur (Şekil 3.21).



Şekil 3.21. *Bacillus pumilus* 44/1 için farklı karbon kaynaklarının siderofor üretimine etkisi

4 farklı karbon kaynağıyla hazırlanan broth besi yerlerindeki hücre büyüme ölçümlerine göre en fazla üreme *Bacillus subtilis* DY3 bakterisi için, glikoz içeren broth besi yerinde görülürken, *Bacillus subtilis* DY5 ve *Bacillus pumilus* 44/1 bakterileri için, en yüksek hücre büyümesi üzüm pekmezi içeren broth besi yerinde gözlenmiştir (Şekil 3.22).



Şekil 3.22. Farklı karbon kaynaklarıyla hazırlanan besiyerindeki hücre büyümesi

4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Sideroforlar biyoteknolojik potansiyeli büyük, kendisi küçük moleküllerdir. Sideroforların biyoteknolojik uygulamaları üzerine yoğun çalışmalar yapılarak, klinik, ziraat, çevre, sağlık ürünleri ve endüstri de dahil olmak üzere günümüzde biyoteknolojinin birçok alanında uygulanabilirliği açıkça görülmektedir. Tüm canlıların yaşamının ve ekosistemin iyileştirilmesinde önemli rol oynayan mikrobiyal sideroforların biyoteknolojik alanda kullanımının, günümüzde olduğu gibi gelecekte de artan bir hızla sürdürülebileceği şüphesizdir [13].

Son yıllarda sekonder bir metabolit olan sideroforların analizi, biyosentez yolları, taşınımı ve demir çözünme mekanizmalarıyla ilgili pek çok çalışma yapılmıştır. Yapılan çalışmalar sideroforların geniş bir uygulama alanına sahip olduğunu göstermektedir.

Bitki büyümesini geliştiren bakteri olarak bilinen floresan pseudomonasların bazı suşları, tohum veya bitkinin yeraltı parçalarına inoküle edildiği zaman bitki patojenlerinin baskılanmasında yer alan pyoverdin ve pyochelin tip sideroforlar üretirler[56]. Pyoverdinler, aslında floresan pseudomonasların sideroforları olan, karakteristik floresan pigmentlerdir [70, 71, 72].

Klebsiella sp.'lerin siderofor ürettiği birçok araştırma tarafından tespit edilmiş ve klinik araştırmalarda antimalarial ajan olarak kullanılabileceği yapılan çalışmalar sonucu gösterilmiştir[24, 40, 41, 68-69].

Siderofor üretim tespitine yönelik son yıllarda pek çok çalışma yapılmıştır. Bu çalışmalar sonucunda tarımsal ilaçların hem bitkide, hem de toprakta toksisiteyi arttırmamasından dolayı zirai mücadelede tarımsal üretim için daha güvenli ve sürdürülebilir araçların geliştirilmesi ve bitki büyümesini teşvik edici olan sideroforların, tercih edilmesi gereken en önemli biyokontrol mekanizmalarından biri olduğu tespit edilmiştir[42, 43, 44].

Aslan ve Özaktan'ın kök bakterileriyle yaptığı çalışmada siderofor üreten bakterilerin, bitki köklerinde ISR(uyarılmış sistemik dayanıklılık)'ı arttırdığı gözlenmektedir. Bunun sonucunda ISR sadece patojen bakterilerin oluşmasını önlemekle kalmayıp aynı zamanda bitkide var olan dayanıklılığı aktive ettiği için bitkiyi hastalıklardan da korumaktadır. Bu sebeple siderofor üretimi ISR' da önemli bir biyokontrol mekanizması oluşturmaktadır [73, 74, 75].

Kök bakterilerinden olan *floresan pseudomonasların* bitki büyümesini teşvik edici bir ajan olduğu ve bitkilerde hastalıkların baskılanmasında rol oynayan hidroksamat tip siderofor ürettiği çeşitli araştırmalarla tespit edilmiştir[76].

Araştırmamızda *M. yunnanensis* DT1, *B. tequilensis* DT2, *B. invictae* DY1, *B. cereus* DY2, *B. subtilis* DY3, *Cellulosimicrobium* sp. DY4, *B. subtilis* DY5, *B. cereus* DY6 , *B. pumilus* 44/1, *P. aeruginosa* ATTC 9027 ve *E. coli* KKÜ bakterileri tarafından üretilen sideroforun tespiti ve *B. subtilis* DY3, *B. subtilis* DY5, *B. pumilus* 44/1 bakterilerinde yüksek verim elde etmek için, siderofor üretimini etkileyen çevresel şartların optimizasyonunu kapsamaktadır. Araştırmamızda kullanılan bütün suşlar tarafından üretilen sideroforların tespiti için CAS deneyi yapılmıştır. Deneylerimizde yüksek oranda siderofor ürettiğini bildiğimiz *P. aeruginosa* ATTC 9027 ve *E. coli* KKÜ bakterileri pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Siderofor tayini öncelikle CAS agarda gerçekleştirilmiş ve kullanılan tüm bakteri türlerinde siderofor varlığını gösteren turuncu renkteki zonlar gözlenmiş ve bu turuncu zonlar pozitif olarak değerlendirilmiştir.

Chrome Azurol S sıvı deneyi, Chrome Azurol S agar deneyine göre daha kısa sürede sonuç vermesi ve sonuçlarının kantitatif yönden yeterli olması nedeniyle daha avantajlı bir metot olarak bulunmuştur. CAS agar ve CAS likit deneyleri sonucunda en fazla siderofor üreten üç suş seçilmiş ve bundan sonraki optimizasyon çalışmaları bu üç izolat üzerinden devam etmiştir.

En yüksek siderofor üretimi *B. subtilis* DY3 suşu için % 42 , *B. subtilis* DY5 için % 33 ve *B. pumilus* 44/1 suşu için % 48 olarak siderofor üretimi tespit edilmiştir.

B.pumilus 44/1, *B. subtilis* DY3 ve *B. subtilis* DY5 bakterilerinin maksimum siderofor üretim zamanı, hücre büyümesinin duraklama dönemine rastlamaktadır ki bu da sideroforların sekonder bir metabolit olduğunu göstermektedir. Maksimum siderofor üretim zamanı araştırma sonuçlarına göre en yüksek siderofor üretimi sırasıyla *B. subtilis* DY3, *B.pumilus* 44/1 ve *B. subtilis* DY5 şeklinde tespit edilmiştir.

Sekonder metabolit olarak durağan fazda üretilmekte olan sideroforlar için optimum gelişim parametrelerinden olan sıcaklık önemlidir. Buradan hareketle optimum sıcaklık deney sonuçları *B. subtilis* DY5 için 25°C, *B.pumilus* 44/1 için 30°C ve *B. Subtilis* DY3 için 37°C olarak tespit edilmiştir.

Siderofor üretimini etkileyen diğer önemli faktör pH'dır. pH demir çözünürlüğünde önemli bir katalizördür, ortamdaki pH'ın durumu bakteri gelişimini ve dolayısıyla da siderofor üretimini etkilemektedir.

Maksimum siderofor üretimi *B.subtilis* DY5 ve *B. pumilus* 44/1 bakterileri için üremenin en az olduğu pH 5.2' de sırayla % 33 ve % 30 olarak tespit edilirken *B. subtilis* DY3 için ise hücre büyümesinin en az olduğu pH 7.3'de % 38 olarak tespit edilmiştir. Hu, ve Xu' nun *B. subtilis* ile yaptığı çalışma sonuçlarına göre siderofor üretim optimizasyon sonucuna göre pH 7.0'de siderofor üretiminin arttığı tespit edilmiştir [79].

Artan ve azalan pH değerleri ortamdaki demir çözünürlüğünü arttırmaktadır. Ortamdaki artan bu demir seviyesi mikroorganizmaların gelişimini etkilemektedir. Nötral pH'da demir çözünürlüğünün azalmasıyla, besi otamındaki kısıtlı demir miktarı siderofor üretimini attırmaktadır. Çalışmamıza göre *B. subtilis* DY3, *B. subtilis* DY5 ve *B. pumilus* 44/1 suşlarından alınan örneklerle göre bu suşlarda asidik pH'dan hafif alkali pH'ya doğru geçtikçe siderofor üretiminde artış gözlenirken. pH 10.0'da hiçbir suşta siderofor üretimi tespit edilememiştir.

Çalışmamıza göre *P. aeruginosa* bakterisi için pH 5.2'de en yüksek siderofor üretimi %31 verimle tespit edilmiştir. Diğer kontrol suşu olan *E. coli*'nin maksimum siderofor üretimi ise pH 7.3'de %39 verimle tespit edilmiştir. Nagar ve arkadaşlarının

P. aeruginosa ile yaptığı çalışmada maksimum siderofor üretiminin pH 7.0'de olduğu tespit edilmiştir [66]. Benzer olarak Tailor ve arkadaşlarının *P. fluorescens* ile yaptığı çalışmada en yüksek siderofor üretiminin pH 7.0'de, en az siderofor üretiminin ise pH 5.0'te olduğu belirlenmiştir [67].

Perinbam ve Kanimozhi' nin *P. fluorescens* ile yaptığı çalışma sonucuna göre siderofor üretiminin, nötr pH'da 24 ile 30 saatlik inkübasyon süresince optimum olduğu bulunmuştur [77].

Sayyed ve arkadaşlarının *A. faecalis* BCCM 2374 ile yaptığı çalışmaya göre pH 5.5 değerinde siderofor üretiminde ve bitki gelişiminde artış olduğu tespit edilmiştir [78].

Siderofor üretimini etkileyen diğer faktör karbon kaynaklarıdır[67]. Karbon kaynaklarının, büyüme ve siderofor üretime etkisini belirlemek için yapılan deney sonuçlarına göre en yüksek siderofor üretimi glikoz varlığında tespit edilmiştir. Glikoz içeren besi ortamında siderofor üretimi sırasıyla *B. pumilus* 44/1 için % 26, *B. subtilis* DY3 için % 38 ve *B. subtilis* DY5 için % 33 olarak bulunmuştur. Bütün suşlar glikoz besi ortamında yüksek oranda siderofor üretmişlerdir.

Melashı besi ortamında ise *B. subtilis* DY3 ve *B. subtilis* DY5 suşları düşük miktarda siderofor üretirken *B. pumilus* 44/1 suşunda %29 oranında siderofor üretimi tespit edilmiştir.

Bir diğer karbon kaynağı olan laktoz varlığında; *B. subtilis* DY3 ve *B. subtilis* DY5 suşlarında en yüksek hücre büyümesi gözlenmiştir, fakat siderofor üretimi diğer karbon kaynaklarına göre daha düşüktür. Buna göre karbon kaynağı olarak glikoz kullanımına oranla laktoz kullanımında, *B. subtilis* DY3'te % 84 ve *B. subtilis* DY5'te % 61 oranında siderofor üretiminde azalma gözlenmiştir.

Diğer karbon kaynağı olan üzüm pekmezi en yüksek ikinci siderofor üretime sahip karbon kaynağı olarak tespit edilmiştir.

Biyomas miktarlarının siderofor üretime etkisini belirlemek için yaptığımız çalışmaya göre 5 farklı biyomas miktarı denenmiş ve buna göre en yüksek siderofor

üretimi *B.subtilis* DY5 için 0.5/100 biyomas oranında %29, *B. subtilis* DY3 için 1/100 biyomas oranında %38, *B. pumilus* 44/1 için 1,5/100 biyomas oranında %35 olarak tespit edilmiştir.

Sonuç olarak yaptığımız çalışmada; *B. subtilis* DY3 bakterisinin siderofor üretimi için optimum koşullar; 37°C’de, pH 7.3’de, 1M glikoz varlığında 1/100 oranında inoküle edildiğinde 24 saat olarak tespit edilmiştir.

B. subtilis DY5 bakterisinin siderofor üretimi için optimum koşullar; 25°C’de, pH 5.2’de, 1M glikoz varlığında, 0.5/100 oranında inoküle edildiğinde 48 saat olarak tespit edilmiştir.

B. pumilus 44/1 bakterisinin siderofor üretimi için optimum koşullar; 30°C’de, pH 5.2’de, 1M melas varlığında, 1.5/100 oranında inoküle edildiğinde 48 saat olarak tespit edilmiştir.

Buna göre çalışmamızda siderofor ürettiği tespit edilen *B. subtilis* DY3’ün, en yüksek siderofor üreten *B. pumilus* 44/1 suşuna göre kısa sürede daha fazla siderofor üretmesi dolayısıyla endüstriyel proseslerde starter suş olarak kullanılması önerilmektedir. Optimizasyonu yapılan bu starter suşun kullanılması için optimum parametreler 37°C’de, pH 7.3’de, 1M glikoz varlığında 1/100 oranında inoküle edildiğinde 24 saat olarak tespit edilmiştir.

KAYNAKLAR

- [1] B. Aydın, *Brevibacillus laterosporus* Türündeki Siderofor Üretiminin Belirlenmesi ve Civa, Nikel, Kobalt, Demir Ağır Metalleri Varlığındaki Değişimi. Yüksek Lisans Tezi. Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü, Gebze, 2014.
- [2] Neilands, J.B., Siderophores: structure and function of microbial iron transport compounds. *The Journal of Biological Chemistry*. 270, 26723-6, 1995.
- [3] Miller, M.J., Siderophores (microbial iron chelators) and siderophore-drug conjugates (new methods for microbially selective drug delivery), 2008.
- [4] Cornelis, P., Andrews, S.C., *Iron Uptake and Homeostasis in Microorganisms*. 302. Caister Academic Press, Norfolk, UK, 2010.
- [5] Chen, Y., Jurkewitch, E., Bar-Ness, E., Hadar, Y., Stability constants of pseudobactincomplexes with transition metals. *Soil Science Society of America Journal*, 58, 390–396, 1994.
- [6] Braud, A., Hannauer, M., Milsin, G.L.A., Schalk, I.J., The *Pseudomonas aeruginosa* pyochelin-iron uptake pathway and its metal specificity. *Journal of Bacteriology*. 191(11): 3517–3525, 2009.
- [7] Miethke, M., Marahiel, M.A., Siderophore-Based iron acquisition and pathogen control. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 71(55), 413-451, 2007.
- [8] Fraenkel G. S., The raison d'etre of secondary plant substances. *Science*, 129 (3361): 1466-1470, 1959.

- [9] Madigan M.T., Martinko J.M., Parker J., Brock biology of microorganisms Chapter 12- 30: Global Edition, 416-444, 966-972, 2003.
- [10] Demain, A.L., Induction of secondary metabolism From natural products discovery to commercialization: a success story. International Microbiology. 1, 259-264, 1998.
- [11] Kraemer. S.M., Iron oxide dissolution and solubility in presence of siderophores. Aquatic Sciences. 66: 3–18, 2004.
- [12] Erdem, B., Bakterilerde Sideroforlar ve Diğer Demir Alım Sistemleri. Enfeksiyon Dergisi. 10, 101-3, 1996.
- [13] Erdem, B., Mikrobiyal sideroforlar ve biyoteknolojideki uygulama alanları. Karadeniz Fen Bilimleri Dergisi. 3(8):77-88, 2013.
- [14] Raymond, K.M., Denz, E., Biochemical and physical properties of siderophores. Iron Transport in Bacteria. 10, 3-17, 2004.
- [15] Bagg, A., Neilands, J. B., Molecular mechanisms of regulation of siderophore-mediated iron assimilation. Microbiol. Reviews. 51: 509, 1987.
- [16] Guerinot, M. L., Microbial iron transport. Annual Review of Microbiology. 48: 743, 1994.
- [17] Ratledge, C., Dover, L. G., Iron metabolism in pathogenic bacteria. Annual Review of Microbiology. 54: 881-941, 2000.
- [18] Skaar, E.P., The battle for iron between bacterial pathogens and their vertebrate hosts. PLOS Pathogens. 6, 12-15, 2010.
- [19] Hammer, N.D., Skaar, E.P., Molecular mechanisms of staphylococcus aureus iron acquisition. The Annual Review of Microbiology. 65, 129-147, 2011.

- [20] Wandersman, C., Delepelaire, P., Bacterial iron sources: from siderophores to hemophores. *Annual Reviews of Microbiology*. 58, 611-47, 2004.
- [21] Tomaras, A.P., Dorsey, C.W., McQueary, C.N., Actis, L.A.,. *Acinetobacter Molecular Biology. Molecular Basis of Acinetobacter Virulence And Pathogenecity*. 265-97. Ed: by U. Gerischer. Caistr Academic Press, Norfolk, 2008.
- [22] Modi P., Kaur A., Kaur M., V.K. Kapoor, Siderophores: a novel approach for iron removal. *International Journal of Universal Pharmacy and Biosciences*. 2, 628-636, 2012.
- [23] De Lorenzo, V., Martinez, J.L., Aerobactin production as a virulence factor; a reevaluation. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectctious Diseases*. 7(5):621-629, 1988.
- [24] Podschun, R., Sieveres, D., Fischer, A., Ullmann, U., Serotypes hemagglutinins, siderophore synthesis and serum resistance of klebsiella isolates causing human urinary tract infections. *The Journal of Infectious Diseases*. 168: 1415-1421, 1993.
- [25] M. Demir, Patojen *Escherichia coli* Suşlarında Siderofor Ve Diğer Virulans Faktörlerinin Araştırılması Ve Patojenitedeki Rollerinin Cilt İnfeksiyon Modeliyle Gösterilmesi. Uzmanlık Tezi. Pamukkale Üniversitesi, Denizli, 2001.
- [26] E. Güney, *Bacillus* Sp. Türlerinde Siderofor Üretimi Ve *Bacillus Cereus* Dsm 4312'De Siderofor Üretiminin Optimizasyonu. Yüksek Lisans Tezi. Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü, Gebze, 2014.

- [27] Quadri, L. E., Assembly of aryl-capped siderophores by modular peptide synthetases and polyketide synthases. *Molecular Microbiology*. 37(1): 1-12, 2000.
- [28] Crosa, J.H., Walsh, C.T., Genetics ve assembly line enzymology of siderophore biosynthesis in bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 66 (33), 223-49, 2002.
- [29] Ackerley, D.F., Caradoc-Davies, T.T., Lamont, I.L., Substrat especificity of the nonribosomal peptide synthetase pvdd from *pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*. 185, 2848-55, 2003.
- [30] Challis, G.L., A widely distributed bacterial pathway for siderophore biosynthesis independent of nonribosomal peptide synthetases. *Combining Chemistry and Biology*. 6(4):601-11, 2005.
- [31] Huyer, Marianne, Page, William, J., Zn^{2+} Increases siderophore production in *azotobacter vinelandii*. *Applied and Environmental Microbiology*, 54: 2625-2631, 1988.
- [32] Weinberg, E.D., Iron and infection. *Microbiological reviews*. 42 (1), 45-66, 1978.
- [33] Varma, A., Chincholkar, S.B., *Soil Microbiology: Microbial Siderophores* 12th Ed: by Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Germany, 978-3-540-71159-9, 2007.
- [34] S. Akyıldız, Gıda Kaynaklı Salmonella İzolatlarında Biyofilm Varlığının Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi. Gazi Üniversitesi, Ankara, 2015.

- [35] Lehoux, D.E., Sanschagrin, F., Levesque, R.C., Genomics of the 35-Kb Pvd locus and analysis of novel pvdijk genes implicated in pyoverdine biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiology Letters*. 190:141–146, 2000.
- [36] Barry, S.M., Challis, G.L., Recent advances in siderophore biosynthesis. *Current Opinion in Chemical Biology*. 13:1–11, 2009.
- [37] Hider, R.C., Kong, X., Chemistry and biology of siderophores. *Natural Product Reports*. 27: 637–657, 2010.
- [38] Bergeron, R.J., Brittenham, G.M., The developmentn of iron chelators for clinical use. CRC Press, Boca Raton, Florida, 1993.
- [39] Del Olmo, A., Caramelo, C., SanJose, C., Fluorescent complex of pyoverdin with aluminum. *Journal of Inorganic Biochemistry*. 97: 384–387, 2003.
- [40] Johnson, P.A., Bebington, G.B., Landa, A.S.M., Anthony, S. Mckay, V.A., Deodorant produots. US patent no. 6: 490, 2003.
- [41] Krewulak, K.D., Vogel, H.J., Structural biology of bacterial iron uptake. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1778: 1781–1804, 2008.
- [42] Helen, W., Boucher, George H , John S Bradley, John E Edwards, David Gilbert, Louis B Rice, Michael Scheld, Brad Spellberg, John Bartlett
- [43] Boucher, H.W., Talbot, G.H., Bradley, J.S., Edwards, J.E., Gilbert, D., Rice, L.B., Scheld, M., Spellberg, B., Bartlett, J., No Drugs: No ESKAPE! An Update From the Infectious Diseases Society of America. *Clinical Infectious Diseases*. 1;48(1):1-12, 2009.
- [44] Spellberg, B., Guidos, R., Gilbert, D., Bradley, J., Boucher, H.W., Scheld, W.M., Bartlett, J.G., Edwards, J., Jr. The epidemic of antibiotic-resistant infections: a call to action for the medical community from the infectious

diseases society of america. *Clinical Infectious Diseases*. 15;46(2):155-64, 2008.

- [45] Projan, S.J., Why is big pharma getting out of antibacterial drug discovery?. *Current Opinion in Chemical Biology*. 6 (5): 427-30, 2003.
- [46] Levy, B.S., Marshall, B., Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. *Nature Medicine*. 10, S122-S129, 2004.
- [47] Juárez-Hernández, R.E., Miller, P.A., Miller, M.J. Syntheses of siderophore–drug conjugates using a convergent thiol–maleimide system. *ACS Medicinal Chemistry Letters*. 11:3 (10):799-803, 2012.
- [48] Mislin, G.L.A., Schalk, I.J., Siderophore-dependent iron uptake systems as gates for antibiotic Trojan horse strategies against *Pseudomonas aeruginosa*. *Metallomics*. 6(3): 408-420, 2014.
- [49] Möllmann, U., Heinisch, L., Bauernfeind, A., Köhler, T., Ankel-Fuchs, D., Siderophores as drug delivery agents: application of the "trojan horse" strategy. *Biometals*. 22(4):615-624, 2009.
- [50] Page, M.G.P., Siderophore conjugates. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1277:115-26, 2013.
- [51] Zheng, T., Nolan, M.E., Enterobactin-mediated delivery of β -lactam antibiotics enhances antibacterial activity against pathogenic *Escherichia coli*. *Journal of the American Chemical Society*. 9;136(27):9677-91, 2014.
- [52] Vessey, J.K., Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant and Soil*. 255:571–586, 2003.
- [53] Altın, N., Bora, T., Bitki gelişimini uyaran kök bakterilerinin genel özellikleri ve etkileri. *Anadolu Journal of the Aegean Agricultural Research Institute (AARI)*. 15 (2), 87 – 103, 2005.

- [54] Weller, D.M., *Pseudomonas* biocontrol agents of soilborne pathogens: looking back over 30 years. *Phytopathology*. 97: 250–256, 2007.
- [55] Cornelis, P., Matthijs, S., *Pseudomonas* Siderophores ve their biological significance. *Soil Biology*. 12: 193-203, 2007.
- [56] Couillerot, O., Prigent-Combaret, C., Caballero-Mellado, J., Moënne-Loccoz, Y., *Pseudomonas fluorescens* and closely-related fluorescent pseudomonads as biocontrol agents of soil-borne phytopathogens. *Letters in Applied Microbiology*. 48: 505–512, 2009.
- [57] Sahu, G. Sindhu, S., Disease control and plant growth promotion of green gram by siderophore producing *pseudomonas* sp. *Research Journal of Microbiology*. 6: 735–749, 2011.
- [58] Sunita, S., Lakshminarayana, K., Gupta, P.P., Suneja, S., Role of *Azotobacter chroococcum* siderophores in control of bacterial rot and sclerotinia rot of mustard. *Indian Journal of Mycology and Plant Pathology*. 24: 202-205, 1994.
- [59] Winkelmann, G., Microbial siderophore mediated transport. *Biochemical Society Transactions*. 30: 691–696, 2002.
- [60] Eisendle, M., Schrettl, M., Kragl, C., Muller, D., Illmer, P., Haas, H., The intracellular siderophore ferricrocin is involved in iron storage, oxidative-stress resistance, germination ve sexual development in *aspergillus nidulans*. *Eukaryotic Cell*. 5:1596–1603, 2006.
- [61] Ozan, S., Maden, S., Funguslarda siderofor oluşumu. *Selçuk Üniversitesi Selçuk Tarım ve Gıda Bilimleri Dergisi*. 24(3): 118-124, 2010.
- [62] Holinsworth, B., Martin, J.D., Siderophore production by marine-derived fungi. *An International Journal on the Role of Metal Ions in Biology, Biochemistry and Medicine*. 22, 625-632, 2009.

- [63] Philpott, C.C., Protchenko, O., Response to iron deprivation in *saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryotic Cell*. 7(1):20-7, 2008.
- [64] Payne S. M., , Detection, isolation and characterization of siderophores methods. *Methods in Enzymology*, 235, 329-342, 1994.
- [65] Louden, B.C., Haarmann, D., Lynne, M.A., Use of blue agar CAS assay for siderophore detection. *Journal of Microbiology and Biology Education*. 12(1):51-53,2011.
- [66] Syed S.A., Vıdhale N.N., Evaluation Of Siderophore Produced By Different Clinical Isolate *Pseudomonas aeruginosa*. *International Journal of Microbiology Research*. 3(2), 131-135, 2011.
- [67] Tailor A.J., Joshi B.H., Characterization and optimization of siderophore production from *pseudomonas fluorescens* strain isolated from sugarcane rhizosphere. *Journal of Environmental Research And Development*. 6:25-30, 2012.
- [68] Kaleli, İ., Demir, M., Cevahir, N., Yıldırım, U., *Klebsiella* Suşlarında siderofor ve serum direncinin araştırılması. *İnfeksiyon Dergisi*, 20(2):97-101, 2006.
- [69] Küçükler, M., Küçükbaşmacı, Ö., Tekin, M., Akbulut, D., Büyükbaba-Boral, Ö., Anđ, Ö., Serotypes, siderophore synthesis and serum resistance of uropathogenic *Klebsiella* isolates. *Advances in Experimental Medicine Biology*. 485:237, 2000.
- [70] Fujimoto, D.K., Weller, D.M. Thomashow, L.S., Role of Secondary Metabolites İn Root Disease Suppression. In: Inderjit KMM, Dakshini, Einhellig FA (eds) *Allelopathy, organisms, processes and applications*. 330–347. ACS. Symposium Series 582, American Chemical Society. Washington, DC, 1995.

- [71] Walsh, U.F., Morrissey, J.P. O’Gara, F., *Pseudomonas* for biocontrol of phytopathogens: from functional genomics to commercial exploitation. *Current Opinion in Biotechnology*. 12:289–295, 2001.
- [72] G. Aydın, Çeşitli Gıda Ürünlerinden İzole Edilen *Pseudomonas* Türlerinde Siderofor Varlığı, Serum Direnci, Genişlemiş Spektrumlu Beta Laktamaz (Gsbl) Üretimi Ve Antibiyotik Direncinin Belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi. Gazi Üniversitesi, Ankara, 2010.
- [73] Aslan, E., Özaktan, H., Kök bakterileri tarafından konukçu bitkide hastalıklara karşı sistemik dayanıklılığın uyarılması. *Anadolu Journal of the Aegean Agricultural Research Institute (AARI)*. 15 (1), 84 – 100, 2005.
- [74] Altın, N., Bora, T., Serada Hıyar *Fusarium solgunluğu* (*Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum*)’na karşı floresan *pseudomonas*ların etkinliğinin belirlenmesi. *ÇOMÜ Ziraat Fakültesi Dergisi*. 3 (1): 63–71 , 2015.
- [75] Carrillo-Castañeda, G., Muñoz, J.J., Peralta-Videa, J.R., Gomez, E., Gardea-Torresdey, J.L., Plant Growth-Promoting Bacteria Promote Copper and Iron Translocation from Root to Shoot in Alfalfa Seedlings. *Journal of Plant Nutrition*. 26; 9: 1801-1814, 2002.
- [76] Sarma, M.V.R., Sahai, V., Bisaria, V.S., Genetic algorithm-based medium optimization for enhanced production of fluorescent *pseudomonad* R81 and siderophore. *Biochemical Engineering Journal* Vol 47, 100-108, 2009.
- [77] Kanimozhi, S., and Perinbam, K., Siderophore production by *Pseudomonas fluorescens* Lp1 and its application as biocontrol agent. *Journal of Pharmacy Research*. 4(9): 3175-3179, 2011.
- [78] Sayyed, R.Z., Gangurde, N.S., Patel, P.R., Joshi, S.A., Chincholkar, S.B., Siderophore production by *Alcaligenes faecalis* and its application for growth

promotion in *Arachis hypogaea*. Indian Journal of Biotechnology Vol 9, 302-307, 2010.

[79] Hu, Q-P., Xu, J-G., A simple double-layered chrome azurol S agar (SDCASA) plate assay to optimize the production of siderophores by a potential biocontrol agent *Bacillus*. African Journal of Microbiology Research Vol. 5(25), 4321-4327, 2011.

[80] Shaikh, S.S., Wani, S.J., Sayyed, R.Z., Statistical-based optimization and scale-up of siderophore production process on laboratory bioreactor. 3 Biotech 6:69, 2016.

[81] Ferreira, C.M.H., Soares, H.M.V.M., Soares, E.V., Promising bacterial genera for agricultural practices: An insight on plant growth-promoting properties and microbial safety aspects. Science of the total environment, vol 682, 779-799, 2019.

[82] Abirammi, T.V., Suman, A., Gond, S., Sing, R., Siderophore the iron chelator production potential of bacteria associated with diverse crops and growth medium optimization for its high production. International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences. 7(7): 1052-1062, 2018.

[83] Manwar, A.V., Khandelwal, S.R., Chaudhari, B.L., Meyer, J.M., Chincholkar, S.B., Siderophore production by a marine *Pseudomonas aeruginosa* and its antagonistic action against phytopathogenic fungi. Applied Biochemistry and Biotechnology. 118: 243-251, 2004.

[84] Retamal-Morales, G., Mehnert, M., Schwabe, R., Tischler, D., Zapata, C., Chávez, R., Schlömann, M., Levicán, G., Detection of arsenic-binding siderophores in arsenic-tolerating Actinobacteria by a modified CAS assay. Ecotoxicology and Environmental Safety. 157: 176-181, 2018.

- [85] D. Kaya, Pestisitlerin (Sentetik, Doğal Ve Biyopestisit) Mikrobiyal Floraya Etkisi. Yüksek Lisans Tezi. Kırıkkale Üniversitesi. Kırıkkale, 2016.

