

*Pseudomonas putida* NRRL B-13 SUŞU  
TARAFINDAN BENZOİK ASİDİN BİYOLOJİK  
YIKIMINI SAĞLAYAN ENZİMLERİ  
KODLAYAN PLAZMİTLERİN  
STABİLİTELERİNİN BELİRLENMESİ

HANDAN SARAÇ

YÜKSEK LİSANS TEZİ  
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI  
2013

**T.C.  
CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

***Pseudomonas putida* NRRL B-13 SUŞU TARAFINDAN BENZOİK ASİDİN  
BİYOLOJİK YIKIMINI SAĞLAYAN ENZİMLERİ KODLAYAN  
PLAZMİTLERİN STABİLİTELERİNİN BELİRLENMESİ**

**HANDAN SARAÇ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**TEZ DANIŞMANI  
YRD. DOÇ. DR. MUSA SARI**

**SİVAS  
2013**

Bu tez Cumhuriyet Üniversitesi Senatosu'nun 24.09.2008 tarihli ve 009 sayılı toplantısında kabul edilen Cumhuriyet Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü "Tez Yazım Kılavuzu" adlı yönergeye göre hazırlanmıştır.

CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ'NE,  
SİVAS

Bu çalışma Cumhuriyet Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanmış ve jürimiz tarafından Biyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan	Doç. Dr. Şifa TÜRKÖĞLU
Üye	Yrd. Doç. Dr. Ertan Mahir KORKMAZ
Üye	Yrd. Doç. Dr. Musa SARI (Danışman)

ONAY

Bu tez çalışması, 12/09/2013 tarihinde Enstitü Yönetim Kurulu tarafından belirlenen ve yukarıda imzaları bulunan jüri üyeleri tarafından kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Mustafa DEĞİRMENCİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRÜ

## ÖZET

### Yüksek Lisans Tezi

#### ***Pseudomonas putida* NRRL B-13 Suşu Tarafından Benzoik Asidin Biyolojik Yıkımını Sağlayan Enzimleri Kodlayan Plazmitlerin Stabilitelerinin Belirlenmesi**

**Handan SARAÇ**

Cumhuriyet Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Musa SARI

2013; x + 39 sayfa

Çağdaş yaşamın bir sonucu olarak ortaya çıkan kirlilik, günümüzde üzerinde en çok durulan ancak, en az çözüm getirilebilen konulardan biridir. Bu çeşit kirlilikten bir tanesi de petrol ve onun rafine ürünleri içinde önemli oranlarda bulunan benzen ve onun alkillenmiş türevleri olan tipik aromatik halkalı bileşiklerdir. Esasen, tüm aromatik hidrokarbonlar birer benzen türevidir. Bu bileşikler her ne kadar yapı olarak halkasal alkanlara benzerlik gösterebilirler de, daha kararlıdır ve alkanların uğradıkları reaksiyonlara uğramazlar. Bu nedenle, daha tehlikeli çevresel kirleticiler olarak görülmektedirler. Canlılar tarafından yapılmayan bu maddeler dolayısıyla ile hemen hemen bütün canlılar için toksik özellik taşırlar. Bu maddeler ile kirlenmiş çevrelere uygulanan fiziksel ve kimyasal dekontaminasyon metotları tam ve etkili bir çözüm getirmekten uzaktır. Dolayısıyla ile son yıllarda bu tür işlemler için biyokimyasal metotların potansiyel kullanılabilirliği araştırılmış ve özellikle bu maddeleri daha zararsız bileşiklere yıkmak için gerekli olan gen sistemleri ile donatılmış *Pseudomonas* bakterisi türlerinin alternatif kullanım alanı bulabileceği saptanmıştır.

*Pseudomonas putida*'nın toluen, benzoik asit ve ksilen gibi toksik hidrokarbon gruplarına karşı toleransa sahip olduğu görülmüştür.

Bu çalışma, önemli endüstriyel aromatik kirleticilerden birisi olan benzoik asidin biyolojik yıkımını gerçekleştiren mikroorganizmalardan biri olan *Pseudomonas putida* NRRL B-13 suşunda bulunan plazmitlerin stabilitelelerini tespit etmek amacıyla planlanmıştır.

Bu çalışma kapsamında, *Pseudomonas putida* NRRL B-13 suşu önce benzoik asit içeren sıvı besiyerinde üretildi ve bir kısmı alınarak plazmit DNA izolasyonunu takiben agaroz jelde yürütüldü. Daha sonra geriye kalan bakteriler başka bir karbon kaynağı (glukoz) içeren sıvı besiyerinde çoğaltıldı. Her jenerasyon (nesil) sonrasında bu besiyerinden örnekler alındı ve plazmit DNA izolasyonu yapılarak agaroz jelde yürütme yapıldı. Glukoz içeren sıvı besiyerine alınmadan önce yapılan agaroz jel elektroforezindeki bantlar esas alınarak, glukoz içeren sıvı besiyerine alındıktan sonra yapılan agaroz jel elektroforezine ait bantlar karşılaştırıldı. Yapılan karşılaştırmada, band belirginliğinin ve kalınlığının her jenerasyon (nesil) sonrasında giderek azaldığı ve IV. jenerasyonda (nesilde) ise tamamen kaybolduğu tespit edildi. Böylece, benzoik asidin yıkımında rol oynayan plazmitlerin stabilitesini IV. nesile (jenerasyon) kadar koruduğu belirlenmiş oldu.

**Anahtar Kelimeler:** : *Pseudomonas sp.*, benzoik asit, plazmit

## SUMMARY

### Master of Science Thesis

#### **Examination of Stability of the Plazmites Encoding the Enzymes Responsible for Biodegradation of Benzoic Acid Using *Pseudomonas putida* NRRL B-13 Strain**

**Handan SARAÇ**

Cumhuriyet University, Graduate School of Natural Sciences

Department of Biology

Supervisor: Yrd. Doç. Dr. Musa SARI

2013, x + 39 pages

Pollution, arising as a result of modern life, is one of the issues that is discussed the most, but not so many things have been done to prevent it. Oil and its alkylated typical aromatic cyclic component which is the derivative of benzene are among these types of pollutions. In fact, all the aromatic hydrocarbons are a derivative of benzene. These compounds are similar in structure to cyclic alkanes but they are more stable than cyclic alkanes and they do not react as alkanes react. Thus, they are seen as more dangerous environmental pollutants than others. Therefore, these substances which are not generated by living things are toxic to all organisms. Physical and chemical decontamination for these polluted areas are far from a complete and an effective solution. Thus, the potential of biochemical methods are examined and it is found that there may be an area of usage for the *Pseudomonas* species which is equipped with gene system that is necessary for the transformation of these agents to the harmless composites.

It is seen that *Pseudomonas putida* has tolerance for the toxic hydrocarbon groups such as toluen, benzoic acid and xylen.

This study was planned in order to identify the plasmid stabilities which are in *Pseudomonas putida* NRRL B-13, one of the microorganisms that carry out the biological-degradation of benzoic acid which is one of the industrial aromatic pollutants.

First, the strain of *Pseudomonas putida* NRRL B-13 was produced in a liquid medium containing benzoic acid. Then, some of it was taken and following the plasmid DNA isolation, it was held in agarose gel. Later, the remaining bacteria were replicated in a liquid medium containing another carbon source (glycose). After each generation, samples were taken from these medium and agarose gel execution was carried out by performing DNA isolation. There was a comparison between the bands of agarose gel electrophoresis before it has been taken to the glycose feed lot and after it has been taken. In the comparison that has been done, it was detected that the clarity and the thickness of the band gradually decreased and on the 4<sup>th</sup> generation, they were completely disappeared. Thus, it was analysed that the stability of plasmids involved in the breakdown of benzoic acid has remained until the 4<sup>th</sup> generation.

**Keywords:** *Pseudomonas sp.*, benzoic acid, plasmid

## **TEŞEKKÜR**

Yüksek lisans tez çalışmamın her aşamasında yardımlarını esirgemeyen, yapıcı ve yönlendirici fikirleri ile bana daima yol gösteren danışman hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Musa SARI' ya,

Laboratuar çalışmalarında bana destek veren, bilgi ve yardımlarını esirgemeyen Yrd. Doç. Dr. Sevgi DURNA DAŐTAN, Arş. Gör. Ergün KASAKA ve Dr. Mahir BUDAK' a,

Tez çalışmamın başından sonuna kadar ilgi ve yardımlarını esirgemeyen yüksek lisans arkadaşlarım Funda ARAS ve Yavuz YILDIR' a,

Tez yazım süresi boyunca, bana huzurlu bir ortam sağlayan annem Melahat TİDİN ve eşim İkrım SARAÇ'a en derin teşekkürlerimi bir borç bilirim. Teşekkür etmem gereken ve belki de teşekkürü en fazla hak eden biricik kızım sevgili Elif Ada, bu tez büyük oranda sana ayırmam gereken zamanlardan çalınarak yapılmış bir çalışmadır. Bu süreçte gösterdiğin anlayış ve fedakârlığa ne kadar teşekkür etsem azdır.

**HANDAN SARAÇ**

## İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
SUMMARY .....	iii
TEŞEKKÜR .....	v
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
TABLOLAR DİZİNİ .....	viii
KISALTMALAR DİZİNİ .....	ix
SİMGELER DİZİNİ .....	x
<b>1. GİRİŞ</b> .....	1
1.1. Benzoik Asit Hakkında Genel Bilgi.....	1
1.2. <i>Pseudomonas</i> Cinsinin Genel Özellikleri .....	2
1.2.1. Habitatları .....	2
1.2.2. Morfolojisi ve Hücre Yapısı.....	3
1.2.3. Pigmentasyon.....	3
1.2.4. Gelişme Ortamları ve Fizyolojik Özellikleri.....	4
1.2.5. Plazmit DNA.....	5
1.2.6. <i>Pseudomonas putida</i> .....	5
1.3. Bakterilerin Gelişme Evreleri .....	6
1.3.1. Adaptasyon (Uyum) Evresi .....	7
1.3.2. Çoğalma Evresi .....	8
1.3.3. Durgun Evre.....	8
1.3.4. Ölüm Evresi .....	9
1.4. Mikroorganizmaların Biyodegradasyondaki Rolü .....	9
<b>2. MATERYAL VE METOT</b> .....	12
2.1. Kullanılan Cihaz ve Kimyasallar .....	12
2.2. Benzoik Asit İçerikli Minimal Besiyerinin Hazırlanması.....	13
2.3. Bakteri Ekimi .....	14
2.4. Absorbans Ölçümü.....	14
2.5. Plazmit DNA İzolasyonu .....	14
2.6. Glukoz İçerikli Minimal Besiyerine Transfer İşlemi .....	16
2.7. Agaroz Jel Elektroforezi .....	17
<b>3. BULGULAR</b> .....	18
<b>4. TARTIŞMA VE SONUÇ</b> .....	31
<b>KAYNAKÇA</b> .....	34
<b>ÖZGEÇMİŞ</b> .....	38

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Benzoik asit ( Benzen karboksilik asit) .....	2
Şekil 2. <i>Pseudomonas</i> 'ın SEM görüntüsü (www.ciriscience.org).....	3
Şekil 3. <i>Pseudomonas putida</i> 'ın morfolojik görüntüsü (www.ciriscience.org).....	6
Şekil 4. Bakterilerin gelişme evreleri (Çotuk, 2007) .....	7
Şekil 5. Benzoik asit içerikli besiyerindeki bakterilerin 600 nm' deki absobans değerleri ile zamana bağlı gelişim basamakları .....	19
Şekil 6. Glukoz içerikli I. nesil bakteri kültürünün 600 nm' deki absorbands değerleri ile zamana bağlı gelişim basamakları .....	21
Şekil 7. Glukoz içerikli II. nesil bakteri kültürünün 600 nm' deki absorbands değerleri ile zamana bağlı gelişim basamakları .....	23
Şekil 8. Glukoz içerikli III. nesil bakteri kültürünün 600 nm' deki absorbands değerleri ile zamana bağlı gelişim basamakları .....	25
Şekil 9. Glukoz içerikli IV. nesil bakteri kültürünün 600 nm' deki absorbands değerleri ile zamana bağlı gelişim basamakları .....	27
Şekil 10. Agaroz jelde yürütülen plazmit DNA bandları.....	28
Şekil 11. Agaroz jelde marker ile birlikte yürütülen plazmit DNA bandları.....	29

## TABLULAR DİZİNİ

<i>Tablo 1. Pseudomonas cinsi bakterilerin sistematigi.....</i>	<i>6</i>
<i>Tablo 2. Benzoik asit içerikli minimal kültür ortamı için kullanılan kimyasal maddeler.....</i>	<i>13</i>
<i>Tablo 3. Glukoz içerikli sıvı besiyeri için kullanılan kimyasal maddeler .....</i>	<i>16</i>
<i>Tablo 4. Benzoik asit içerikli bakteri kültürünün 600 nm 'deki absorbens değerleri.....</i>	<i>18</i>
<i>Tablo 5. Glukoz içerikli I. nesil bakteri kültürünün 600 nm 'deki absorbens değerleri .....</i>	<i>20</i>
<i>Tablo 6. Glukoz içerikli II. nesil bakteri kültürünün 600 nm 'deki absorbens değerleri .....</i>	<i>22</i>
<i>Tablo 7. Glukoz içerikli III. nesil bakteri kültürünün 600 nm 'deki absorbens değerleri.....</i>	<i>24</i>
<i>Tablo 8. Glukoz içerikli IV. nesil bakteri kültürünün 600 nm 'deki absorbens değerleri.....</i>	<i>26</i>

## KISALTMALAR DİZİNİ

log-faz: Logaritmik artış fazı (çoğalma evresi)

DNA: Deoksiribonükleik asit

NAD(P)H: Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat

DHB: 1,2-dihidro-1,2-dihidroksi benzoik asit

asetil CoA: Asetil koenzim A

TCA: Trikarboksilik asit döngüsü

TE: Tris-EDTA

TBE: Tris-Borik asit-EDTA

EDTA: Etilendiamin tetraasetik asit

SDS: Sodyum dodesil sülfat

UV: Ultraviolet

vb: Ve benzeri

vs: Vesaire

bç: Baz çifti

## SİMGELER DİZİNİ

°C: Santigrat

µm: Mikrometre

ml: Mililitre

M: Molar

mM: Milimolar

dk: Dakika

nm: Nanometre

rpm: Revolutions per minute

g: Gram

%: Yüzde

mA: Miliamper

HgCl<sub>2</sub>: Civa klorür-Civa klorid

H<sub>2</sub>S: Hidrojen sülfür

K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>: Potasyum fosfat (dibazik)

(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>: Amonyum fosfat (dibazik)

Mg(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O: Magnezyum nitrat hegzahidrat

MnSO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O: Mangan (II) sülfat monohidrat

FeCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O: Ferik klorid hegzahidrat

CaSO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O: Kalsiyum sülfat dihidrat

C<sub>7</sub>H<sub>6</sub>O<sub>2</sub>: Benzoik asit

NaOH: Sodyum hidroksit

KoAC: Potasyum asetat

## 1. GİRİŞ

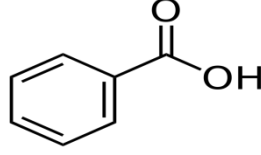
Dünya nüfusunun artması ile birlikte çoğalan insan faaliyetleri ve teknolojik gelişmelerle gerek endüstride gerekse günlük yaşamımızda yaygın olarak kullanılan organik kirleticilerin miktarı ve çeşitliliği, modern yaşamın gereksinimleri karşısında gün geçtikçe artmaktadır. Endüstrideki ilerlemeler ve gelişen tarım teknolojileri, petrol, petrol türevleri ve pestisitler gibi çeşitli kullanım alanlarına sahip olan birçok kirletici ajanın günlük hayatımıza girmesine neden olmaktadır. Bu organik kirleticilerin kullanımındaki artış, çevre sorunları ile birlikte ciddi sağlık sorunlarını da beraberinde getirmektedir (Telefoncu, 1995).

Kirliliğe sebep olan maddelerin daha etkili bir şekilde uzaklaştırılabilmesi için zorlu çevre şartlarında gelişimini sürdürebilen ve çok çeşitli substratları kullanabilen organizmaların elde edilmesine çalışılmaktadır (Bruins ve ark., 2000a; Diaz, 2004).

*Pseudomonas putida* ve diğer *Pseudomonas* türleri birçok kimyasal maddeyi ayrıştırabilecek yapıda plazmit kaynaklı enzimlere sahiptirler. Böylesi enzimlerin sayısı 10'dan fazla değildir. Örneğin; SAL, NAH, ASL ve TOL plazmitleri, sıra ile salisilat, naftalin, alkil benzen sülfonat ve tolueni ayrıştırarak katekole çevirir ve sonra da plazmitlerce kodlanan enzimler tarafından asetaldehite ve pirüvatlara dönüştürür (Geçkil ve ark., 2003). Bu nedenle bu çalışmada çevrede kirlilik yaratan ve canlılar üzerinde toksik etkileri bakımından risk teşkil eden aromatik hidrokarbonlardan biri olan benzoik asidin, *Pseudomonas putida* NRRL B-13 suşu tarafından biyolojik yıkımının sağlanabilmesi için gerekli enzimleri kodlayan genlerin bulunduğu plazmitlerin stabilitesinin tespit edilmesi amaçlanmaktadır.

### 1.1. Benzoik Asit Hakkında Genel Bilgi

Benzoik asit, aromatik bir hidrokarbondur ve kararlı bir yapıya sahip olduğu için çevredeki eliminasyonu oldukça zordur (Kahraman ve Geçkil, 2005). Genel formülü  $C_6H_5COOH$ 'dır. Bu bileşik ilk kez 1988 yılında Avrupa'da üretilmiştir. % 60 kadarı fenolden, % 30'u ise kaprolaktamdan elde edilmiştir. % 5'i sodyum ve diğer benzoatlar, % 3 ü benzoil-klorür, benzoat esterleri, metilbenzoat ve diğer ürünlerin eldesinde kullanılmaktadır (Pine,1987).



**Şekil 1.** Benzoik Asit ( Benzen karboksilik asit)

Benzoik asit, beyaz renkli iğne ve yaprakçık görünümünde bir maddedir. Benzoik asit birçok bitkinin yaprak, kabuk ve meyvelerinde bulunur. Aynı zamanda, gıdalarda mikrobik bozulmayı önlemek için kullanılır. İlave edildiği gıdanın tadını etkiler (Fish ve ark., 2000; Chayabutra ve Ju, 2000). En çok kullanıldığı alanlar, meyve suyu, marmelat, reçel, gazlı içecekler, turşular, ketçap ve benzeri ürünlerdir. Benzoik asit, genellikle sodyum tuzu olarak (sodyum benzoat) kullanılır. Ayrıca; hem benzoik asit hem de ester ve tuzları diş macununda, salisilik asitle birlikte ilaç eldesinde kullanılmaktadır (Geçkil ve ark., 2003).

Benzoik asidin erime noktası 121,4°C, kaynama noktası 249,2°C' dir. Sıcak suda ve organik çözücü karışımında kolaylıkla eriyerek çözünür (Pekcan ve Aktaş, 2005).

## **1.2. *Pseudomonas* Cinsinin Genel Özellikleri**

### **1.2.1. Habitatları**

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

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

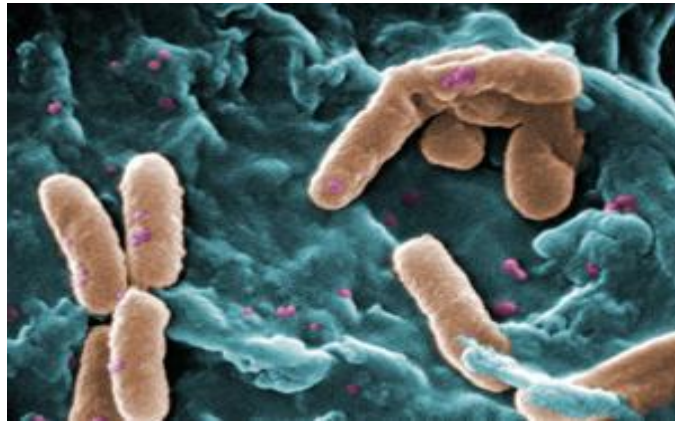
Çeşitli bitkilerden de izole edilen *Pseudomonas* türleri bulunmaktadır. Çavdar, zeytin, fasulye, leylak, patates ve şeker pancarından *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas syringae* ve *Pseudomonas aeruginosa* suşları izole edilmiştir (Hirano ve ark., 2000). Ayrıca deniz kaplumbağasının (*Caretta caretta* L.) derisinden *Pseudomonas fluorescens* izole edilmiştir (Cabanés ve ark., 1997). Sadhukhan ve ark.

(1997), balık solungacından ve midesinden *Pseudomonas* türlerini izole etmişler ve bakterinin HgCl<sub>2</sub>'ye dirençli olduğunu bildirmişlerdir.

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

### 1.2.2. Morfolojisi ve Hücre Yapısı

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



Şekil 2. *Pseudomonas*'ın SEM görüntüsü ([www.ciriscience.org](http://www.ciriscience.org))

### 1.2.3. Pigmentasyon

Pigmentasyon, bakteriler tarafından renkli koloni üretimi veya besiyeri yüzeyine pigment salgılanması olup pigment üreten *Pseudomonas* türlerinin ayırımında kullanılan önemli bir özelliktir (Keskin ve ark., 2003). *Pseudomonas*'lar tarafından üretilen pigmentlerin antibiyotik ve bakteriyosin özelliğine sahip olduğu belirtilmiştir (Vachee ve ark., 1997). Bakteriyel pigmentler sekonder metabolitlerden olup, optimum şartları çok değişken olmakla birlikte, gelişme sıcaklığı, ortamı ve besiyeri içeriklerine bağlı olarak farklı renklerde oluştururlar (Kanner ve ark., 1978). Hassen ve ark. (1998b),

çalışmalarında kullandıkları *Pseudomonas* cinsine ait türlerin, çinko varlığında pyoverdin pigmentini daha fazla sentezlediklerini ve çinkonun pigment üretimini arttırdığını göstermişlerdir.

*Pseudomonas aeruginosa*, *P. putida*, *P. fluorescens*, *P. chlororaphis*, *P. syringae* ve *P. cichorii* gibi türler düşük demir içerikli besiyerlerinde bol miktarda fluoresans pigmentleri üretmektedirler (Meyer ve ark., 1990; Vachee ve ark., 1997). Günümüzde King A (*Pseudomonas* Agar F) ve King B (*Pseudomonas* Agar P) gibi spesifik besiyerleri kullanılarak *Pseudomonas* cinsine ait türlerin fluoresans pigmentleri üretilip üretilmediği tespit edilebilmektedir (Vachee ve ark., 1997; Keskin ve ark., 2003). *P. fluorescens*'in King B besi ortamında fluoresin ürettiği bildirilmiştir (Baumann ve ark., 1972).

Fenazinler *Pseudomonas*'ların suda çözünebilir pigmentleridir. Suda çözünen pigmentler içinde en çok bilinenleri pyoverdin ve pyocyanindir. Diğer fenazin pigmenti ise, özellikle *P. chlororaphis* için karakteristik olan, suda diğer pigmentlere kıyasla daha az çözünebilir ve koloni etrafında kristalize olma özelliğine sahip yeşil bir pigment olan klororafin (chlororaphin)dir (Kanner ve ark., 1978). Lemonnierin *P. lemnierii* suşu için karakterize olan hücre içinde bulunan çözünmeyen bir pigmenttir (Fuller ve ark., 1971). Karotenoidler genellikle sarı veya turuncu renkli, suda çözünmeyen ve *P. alcaligenes*, *P. mendocina*, *P. versicularis*, *P. flava*, *P. pseudoflava*, *P. palleronii*, *P. rhodos*, *P. echinoides* ve *P. radiosa* gibi birçok tür tarafından üretilen pigmentlerdir (Fuller ve ark., 1971). Yaşlı *Pseudomonas* kültürlerinde (10 günlük) melanin pigmentlerinin üretildiği de tespit edilmiştir (Hassen ve ark., 1998b).

#### **1.2.4. Gelişme Ortamları ve Fizyolojik Özellikleri**

*Pseudomonas*'ların birçok türü amonyum iyonları veya nitrat ile enerji veya karbon kaynağı olarak tek bir organik madde içeren çok basit mineral besiyerlerinde gelişebilmektedir (Baumann ve ark., 1972). Virülans faktörü olarak hemolizine sahip olan *P. aeruginosa* suşları kanlı besiyerlerinde hemoliz oluştururlar. Glukoz ve bazı karbohidratları oksidasyon yolu ile parçalayıp asit oluştururlar. Laktoz ve sukroza etki etmezler. İndol ve H<sub>2</sub>S oluşturmazlar. Metil kırmızısı ve Voges proskauer testleri negatiftir. Kemoorganotrofik türleri fakültatif kemolitotrof olup enerji kaynağı olarak hidrojen ve karbonmonoksiti kullanabilirler. Çoğunluğu aerobik olup bazı türleri nitratı kullanarak anaerobik olarak gelişebilir. Üreyi amonyak haline ya da amonyağı üreye çevirebilirler ve bunları azot kaynağı olarak kullanabilirler. Çoğu asidik ortamlarda

gelişemezler. Oksidaz pozitif veya negatif olabilirler. Katalaz pozitif olup lizin ve ornitini dekarboksile etmezler. *Pseudomonas* türlerinin tek karbon kaynağı içeren basit besiyerlerinde gelişebilme yetenekleri karakterizasyon yapılması için temel oluşturmaktadır. Bu organik bileşiklerin sayısı ve tiplerinin değiştirilmesi ile gelişmeyi sağlayan bileşikler tespit edilerek, sabit kimyasal içerikli besiyerlerine bu bileşiklerin ilavesi ile izole edilen türlerin tanımlanmasına önemli katkılar sağlanmıştır (Cowan ve ark., 1974).

### **1.2.5. Plazmit DNA**

*Pseudomonas*'lar antibiyotiklere, metallere, antibakteriyel ajanlara, bakteriyofajlara, bakteriyosinlere ve fiziksel ajanlara karşı dirençlilik sağlayan ve farklı metabolik özellik kazandıran plazmitlerce taşınan genler bakımından oldukça zengindirler. Plazmitlerin bazıları gelişme şartlarında rol alırken, bazıları çeşitli ajanlara (R plazmitleri) karşı dirençliliğe, bazıları ise daha önce kullanılmamış karbon kaynaklarını kullanabilme kapasitesine etki ederler (Bruins ve ark., 2000a). Böylece bu cinsin üyelerine çok yönlü fayda sağlamış olurlar. Son zamanlarda *Pseudomonas* cinsine ait birçok plazmit yapısı açıklanmıştır. En iyi bilineni bazı *P. putida* suşlarında bulunan TOL adındaki katabolik plazmit olup toluen, ksilen ve benzer aromatik bileşikler varlığında gelişme yeteneğini kodlamaktadır (Silver, 1992).

### **1.2.6. *Pseudomonas putida***

Gram negatif, sporsuz, düz kenarlı ya da hafif oval çomak şekilli olan bu bakteri, tipik olarak bir ya da daha fazla polar flagella ile hareketlidir (Şekil 3). Boyutlar 0,5–1,0 µm, 1,5–4,0 µm arasında değişir. Mezofilik olduklarından optimum üreme sıcaklığı 25–30 °C'dir (Güç ve ark., 2010).

Bu türün bazı suşları, organik büyüme faktörlerinin bulunmadığı ortamda, düşük molekül ağırlıklı organik molekülleri kullanabilmeleri gibi çok yönlü beslenme özellikleri ile tanınırlar. Üre, nişasta ve jelatini hidroliz eder, sitratı karbon kaynağı olarak kullanabilirler. Katalaz testi, flouresin pigmenti oluşumu ve arjinin hidrolizi pozitifdir (Güç ve ark., 2010).

Bu tür 4°C'de üreyebilmekte, 42°C ve 60°C'da gelişme gösterememektedir. Glukoz ve sakkarozu asit oluşturarak metabolize edebilmelerine rağmen, maltoz, laktoz, fruktoz, mannitol ve ksiloz şekerlerini metabolize edemezler. *P. putida*'nın sistematığı Tablo 1'de verilmiştir (Güç ve ark., 2010).

*P. putida* bakterileri saprofitik, aerobik metabolizmalı, bir veya daha çok kamçıyla hareket edebilen ve geniş bir organik madde çeşitliliğinde büyüeyebilen canlılardır. Özellikle düşük molekül ağırlıklı organik bileşikleri kullanabilirler (Şekil 3).

*P. putida* bu genusa ait türlerden; lesitinaz ve lipaz aktivitelerinin olmayışı, sükrozdan levan üretmeyişi ve jelatini sıvılaştırmayışları gibi olumsuz özelliklerle farklılık sergilerler. *P. putida* suşu iki biyotipte gruplandırılabilir. Biyotip A tipik *P. putida* özellikleri gösterirken, biyotip B, *P. fluorescens*'e daha yakın benzerliktedir. Biyotip A suşları DNA homolojilerinde önemli ölçüde heterojenliğe sahipken, fenotipinde homojen özellik göstermektedir (Pazarlıoğlu, 1996).

**Tablo 1.** *Pseudomonas* cinsi bakterilerin sistematigi

<b>Alem</b>	<i>Bacteria</i>	
<b>Şube</b>	<i>Proteobacteria</i>	
<b>Sınıf</b>	<i>Gamma Proteobacteria</i>	
<b>Takım</b>	<i>Pseudomonadales</i>	
<b>Aile</b>	<i>Pseudomonadaceae</i>	
<b>Cins</b>	<i>Pseudomonas</i>	
<b>Tür</b>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>P. putida</i>

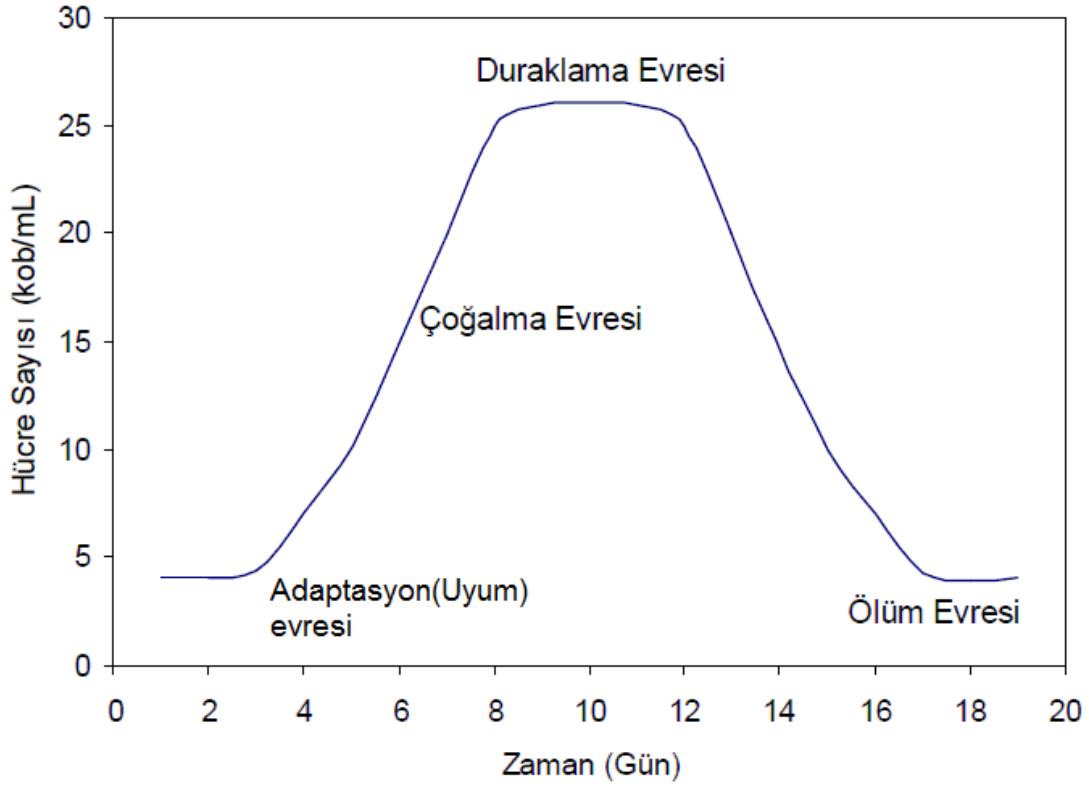


**Şekil 3.** *Pseudomonas putida*'ın morfolojik görüntüsü ([www.ciriscience.org](http://www.ciriscience.org))

### 1.3. Bakterilerin Gelişme Evreleri

Bakteri kültürlerinin besiyerine ekimleri uygun koşullar altında gerçekleştirilirse, bakteriler verimli bir şekilde ürerler ve çoğalabilirler. Bakteri kültürlerinin gelişmesi zamana karşı canlı sayısı veya hücre sayısının logaritması alınarak grafik olarak

şekillendirilir. Bakterilerin gelişme evreleri uyum (latent) dönem, çoğalma (logaritmik, ekspanensiyal veya üreme) dönemi, duraklama dönemi ve ölüm dönemi olmak üzere 4 aşamadan oluşmaktadır (Şekil 4).



Şekil 4. Bakterilerin gelişme evreleri (Çotuk, 2003)

Bu dönem sırasında besin maddesi ilavesi olmazsa veya atık maddeler alınmazsa, bu gibi kapalı sistemlerdeki gelişmeye *durgun kültür* adı verilir. Çok hücreli organizmaların gelişmesinde de aynı kurallar geçerlidir. Böylece durgun kültür, genetik olarak sınırlandırılmış çok hücreli organizmalar gibi davranış gösterir (Çakmakçı ve ark., 1995).

### 1.3.1. Adaptasyon (Uyum) Evresi

Yeni bir besiyerine ekim yapılmış bakteri hücreleri birdenbire çoğalmazlar. Adaptasyon evresi bakteri hücrelerinin ortama uyum sağlama ve üreme dönemidir. Aşılandıkları yeni çevreye uyum gösterebilmeleri için zaman gereklidir. Bu devrede üreme olmadığından populasyon sayısı değişmez, fakat populasyonun her bireyinin büyüklüğü artar. Hücreler fizyolojik bakımdan çok aktiftirler ve üremeleri için gerekli enzimleri ve koenzimleri (bir enzimi aktif hale getiren, enzimin protein olmayan bileşeni) sentez ederler. Kuluçka evresinin gerçek uzunluğu kültürün yaşına, besiyerinin uygunluğuna, bakteri türüne, çevresel koşullara (pH, ısı, osmotik basınç, yüzey gerilimi,

oksijen vs.) besiyerinin bileşimine ve daha önceki kültürün gelişmesine bağlıdır. Örneğin ekilen bakteriler bir önceki kültürün durgunluk veya ölüm döneminden alınmışsa, latent dönemi uzun olabilir (Çotuk, 2007).

### **1.3.2. Çoğalma Evresi**

Çoğalma evresinde gerekli maddeleri sentezleyen ve latent fazı geçen mikroorganizmalar, belli aralıklarla hücre sayıları katlanarak artmaktadır ve sabit maksimum gelişme ile karakterize edilir. Gerçek logaritmik bölünme oranı, özel organizma ve gelişme koşullarına bağlıdır. Pek çok bakteride hücre büyüklüğü ve protein içeriği çoğalma evresinde sabittir. Bakteriler ikiye bölünerek çoğalırlar, çoğalmaları geometrik artış gösterir (20, 21, 22, 23...  $2^n$  gibi). Her bakteri türünün kendine özgü bir jenerasyon süresi vardır. *E. coli*'de bu 15-20 dakika arasında değişirken, diğerlerinde (mikobakterilerde) 800-900 dakika olabilir. Bazı termofilik bakterilerde daha kısadır. Kültür ortamındaki esas besin maddeleri, genellikle karbon ve enerji kaynağı organizma tarafından kullanılması sonucu devamlı azalmasına karşın üreme hızının nasıl sabit kalabildiği sorusu sorulabilir. Bu soruya yanıt şu şekilde verilebilir. Substrat konsantrasyonu yüksek olduğu zaman, konsantrasyondaki bir değişme üreme üzerine çok etkili olacaktır. Ancak substrat konsantrasyonu çok düştüğü zaman büyüme hızı önemli derecede düşmeye başlar. Bakteriler, laboratuvarında gereksinimlerinden fazla substrat seviyesi, üreme hızına etki edecek seviyeye düşmeden önce, birçok jenerasyon geçirerek sabit bir ekponensiyal hızda çoğalabilirler. Üremenin logaritmik fazında, genellikle hücreler tek tiptir ve diğer fazlardakinden daha sınırlı fiziksel ve kimyasal koşullarda bulunurlar. Bu nedenle mikrobiyal metabolizma çalışmalarında log-faz kültürleri yaygın olarak kullanılır (Çotuk, 2007).

### **1.3.3. Durgun Evre**

Mikroorganizmalar, başlıca besinlerin ve elektron alıcılarının azalmasından ve zehirli maddelerin oluşması ve birikmesinden dolayı gelişemezler. Bu evrede gelişme oranı diğer faktörlere ve cevher konsantrasyonuna da bağlıdır. Çünkü kültürün gelişme oranındaki azalma tüm cevherin tüketimi ile başlar. Çoğalma evresinden duraklama evresine geçiş genellikle görecelidir. Duraklama evresinde enzimler sürekli olarak kullanılamaz hale gelir (Çotuk, 2007).

#### 1.3.4. Ölüm Evresi

Bu evrede ölen hücre sayısı, çoğaldan daha fazladır. Ortamda besin kalmayınca veya gelişmeyi engelleyen zararlı metabolitler artınca, mikroorganizmanın gelişmesi ve çoğalması durmaktadır (Çakmakçı ve ark., 1995). Bakteriler farklı hızda çoğaldıkları gibi, farklı hızda ölürlür, bazı gram-negatif koklar çok hızlı ölürlür, 72 saat sonra veya daha kısa sürede, kültürde çok az sayıda canlı bakteri kalabilir. Diğer türler çok yavaş ölürlür. Canlı hücreler aylar, hatta yıllar sonrada rastlanabilir. Üremenin dört fazının gerçekleştiği kültüre *kesikli kültür* denir. Kesikli kültürde bakterilerin daima bir yeni besiyerine nakledilmeleri (pasaj yapma) zorunluluğu vardır. Devamlı kültür, statik veya kesikli kültürde eksponensiyal üreme kısa bir dönemle sınırlanırken, devamlı kültür sisteminde üreme sürekli eksponensiyel fazdadır. Bu üreme, kültüre devamlı besin solüsyonunun ilavesi ile sağlanır (Çotuk, 2007).

#### 1.4. Mikroorganizmaların Biyodegradasyondaki Rolü

Organik kontaminantlar, mikroorganizmalar tarafından mikrobiyal transformasyona uğratılmaktadır. Karbon kaynağı ve elektron verici olmak üzere mikroorganizmalar kontaminantları iki amaç için kullanmaktadır (Diaz, 2004). Yapılan çalışmaların çoğunda *Achromobacter*, *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Flavobacterium*, *Nocardia* ve *Pseudomonas* cinslerine ait türlerin karasal ve sucul alanlardaki hidrokarbonları parçalayabildiği rapor edilmiştir (Leahy ve ark., 2003).

Mikroorganizmaların biyodegradatif özelliklerinin kaynağının kromozomal DNA, plazmit DNA veya transpozonlar üzerinde taşınan genler olduğu rapor edilmiştir (Kotsal ve ark., 1998). Transpozonlar, kromozomal DNA-plazmit DNA veya plazmit DNA-plazmit DNA arasında zıplayabilen gen parçalarıdır. Bakterilere biyodegradatif özelliğin yanı sıra antibiyotik dirençliliği gibi bazı avantajlar da sağlamaktadır. Bakteriler, doğal yaşam ortamlarında kirleticileri enerji ve karbon kaynağı olarak kullanabilme yeteneğine sahiptirler. Ancak mikroorganizmaların degradatif özelliği çevre şartlarından etkilenmektedir. Bu nedenle kirliliğe sebep olan maddelerin daha etkili bir şekilde uzaklaştırılabilmesi için zorlu çevre şartlarında gelişimini sürdürebilen ve çok çeşitli substratları kullanabilen organizmaların elde edilmesine çalışılmaktadır (Bruins ve ark., 2000a; Diaz, 2004).

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

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

Aerobik şartlar altında, aromatik hidrokarbonlar, bakteri oksijenazları tarafından okside edilebilirler. Bu enzimler, aromatik halkanın içine moleküler oksijenin girmesini NAD(P)H bağlı olarak katalizlerler (Leahy ve ark., 2003). Aerobik bakterilerin benzoik asidi yıkımı sırasında, benzoik asit dioksijenaz enzim aktivitesiyle DHB'ye (1,2-dihidro-1,2-dihidroksi benzoik asit), DHB'de oksidatif dekarboksilasyonu sağlayan DHB dehidrogenaz enzim aktivitesi ile orta ara ürün olan katekole dönüşür. Bu aşamadan sonra katekol,  $\beta$ -ketoadipat yoluyla süksinat ve asetil CoA' ya parçalanarak TCA' ya (trikarboksilik asit döngüsü) girer (Reiner, 1971; Feist ve ark., 1969).

$\beta$ -ketoadipat yolu, protokatekuat ya da katekolün yıkımı sonucu süksinat ve asetil CoA oluşumunu sağlayan metabolik bir yoldur (Kukor ve ark., 1988; Morales ve ark., 2004). Bu yol benzoat ve p- hidroksibenzoatın aerobik bakteriler tarafından yıkımı sırasında yaygın olarak kullanılır (Ornston, 1966) ve reaksiyonlar indüklenebilir enzimlerle katalizlenir (Kemp ve ark., 1968; Hollaway, 1969).

*Pseudomonas* hücrelerine p-hidroksibenzoat girdiği zaman hidroksilaz enzimin sentezini indükler ve bu enzim p-hidroksibenzoatı protokatekuata dönüştürür. Benzoat girdiğinde ise dihidroksilaz enziminin sentezini indükler ve bu enzim benzoatı katekole dönüştürür (Ornston, 1966).  $\beta$ -ketoadipat yolunun sonunda benzoat ve p- hidroksibenzoat süksinat ve asetil CoA' ya kadar parçalanır.

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

Tüm bu bilgiler doğrultusunda, çalışmamızın temel amacı; çevrede kirlilik yaratan ve canlılar üzerinde toksik etkileri bakımından risk teşkil eden aromatik hidrokarbonlardan biri olan benzoik asidin, biyolojik yıkımının sağlanabilmesi için gerekli enzimleri kodlayan genlerin bulunduğu plazmitlerin stabilitesini tespit ederek benzoik asit ile kirlenmiş olan çevrelerin biyo-iyileştirilmesine katkı sağlamaktır. Bu kapsamda, materyal olarak *Pseudomonas putida* NRRL B-13 suşunu kullanarak, karbon kaynağı benzoik asit olan ortamdan, karbon kaynağı glukoz olan ortama ekim yaparak benzoik asidin parçalanmasında rol alan plazmitlerin ortamda benzoik asit olmaksızın kaçınıcı nesile kadar stabilitesini koruduğu belirlenmeye çalışılmıştır.

## **2. MATERYAL VE METOT**

### **2.1. Kullanılan Cihaz ve Kimyasallar**

- 1) Spektrofotometre (Cecil 5000 Series)
- 2) Plastik küvetler
- 3) Etüv (Termal Laboratuvar Aletleri)
- 4) Santrifüj (Eppendorf Centrifuge 5415 D)
- 5) Eppendorf tüp (1,5 ml, Sarstedt)
- 6) Otoklav
- 7) 1000'lik mikropipet (Eppendorf ve Gilson)
- 8) Mikropipet uçları (Beyaz, mavi, Biosphere Filtler Tips)
- 9) 250 ml'lik erlenler
- 10) Benzoik asit
- 11) Potasyum fosfat (dibazik)
- 12) Potasyum fosfat (monobazik)
- 13) Magnezyum klorür
- 14) Demir klorür
- 15) Amonyum sülfat
- 16) Mangan sülfat monohidrat
- 17) Kalsiyum sülfat dihidrat
- 18) Magnezyum nitrat heksahidrat
- 19) Agaroz
- 20) Etidyum bromür
- 21) Gümüş nitrat
- 22) TE tamponu (1xTE)
- 23) TBE tamponu (1xTBE)
- 24) EDTA

- 25) Tris-HCL tamponu (pH=8.0)
- 26) SDS (%1'lik)
- 27) Sezyum klorür
- 28) Sodyum hidroksit
- 29) Etanol
- 30) Potasyum asetat
- 31) Asetik asit
- 32) Fenol kloroform (1/1)
- 33) DNA markırları (100bp'lik)

## 2.2. Benzoik Asit İçerikli Minimal Besiyerinin Hazırlanması

Çalışmada karbon kaynakları farklı olan iki tane minimal kültür ortamı hazırlandı. İlk minimal kültür ortamının karbon kaynağı 0.002 M'lık benzoik asit, ikinci minimal kültür ortamının karbon kaynağı ise glukozdur.

Benzoik asit içerikli minimal kültür ortamı Tablo 2'de gösterildiği gibi hazırlanmıştır (Kahraman ve ark., 2005).

**Tablo 2.** Benzoik asit içerikli minimal kültür ortamı için kullanılan kimyasal maddeler

<u>Besiyeri için kullanılan kimyasal maddeler</u>	<u>Miktar (1000 ml için)</u>
$K_2HPO_4$	1.39 g
$(NH_4)_2HPO_4$	2.5 g
$Mg(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$	0.097 g
$MnSO_4 \cdot H_2O$	0.025 g
$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	0.005 g
$CaSO_4 \cdot 2H_2O$	0.001 g
$C_7H_6O_2$	0.244 g

Kimyasal maddeler 500 ml distile su içerisine eklendi ve manyetik karıştırıcı üzerinde benzoik asidin znmesi beklendi. Benzoik asidin znebilmesi için 2 M'

lık NaOH çözeltisinden 3 ml eklendi. Benzoik asit tamamen çözüldükten sonra karışımın üzerine son hacim 1000 ml oluncaya kadar distile su eklendi ve 1-2 saat daha manyetik karıştırıcıyla karıştırılarak karışım homojen hale getirildi.

Hazırlanan besiyeri, her birine 250'şer ml olacak şekilde dört ayrı erlenmayere bölündü ve 120°C de 15 dk otoklav edildi. Otoklavdan çıkarılan besiyerleri +4°C'de bir gece bekletildi.

### **2.3. Bakteri Ekimi**

Bu çalışmada *Pseudomonas putida* NRRL B-13 suşu kullanılmıştır. Stok bakteri kültüründen 2 ml alınarak, erlen içerisinde bulunan ve karbon kaynağı olarak benzoik asit içeren 250 ml'lik sıvı besiyerine ekim yapıldı. Besiyerine bakteri ekimi yapılırken kontaminasyonu engellemek için çeker ocak altında bek alevi yanında çalışıldı. Ekim yapılan besiyeri sıcaklığı +37°C olan etüv içerisine konuldu.

Ekim yapılmamış benzoik asit içerikli sıvı besiyerleri ise kör olarak kullanılmak üzere +4°C'ye konuldu.

### **2.4. Absorbans Ölçümü**

Deneye başlanılan ilk an (0. zaman)' da dahil olmak üzere, her dört saatte bir kültür ortamından yaklaşık 2'şer ml örnekler alınarak, 600 nm'de bakteri miktarındaki artışı görmek için spektrofotometrede absorbans ölçümü yapıldı. Ölçüm yapılırken plastik küvetlerden birine kör olarak kullanılan ekim yapılmamış benzoik asit içerikli besiyeri konuldu. Örnek alma işlemi sırasında kontaminasyonu engellemek için bek alevi yanında çalışıldı. İçinde ekim yapılmamış besiyeri bulunan plastik küvet spektrofotometredeki bölmelerden birine konuldu, 600 nm' deki absorbansı ölçülerek sıfırlandı, sonrasında bu küvet çıkarılarak aynı bölme içinde örnek bulunan küvet konuldu ve absorbans ölçüldü. Bu ölçüm, değer sabitlenene kadar devam etti. Böylece bakterilerin durağan faza kadar çoğalması sağlandı.

### **2.5. Plazmit DNA İzolasyonu**

Benzoik asit içeren sıvı besiyerinde bakterilerin çoğalması sağlandıktan sonra kültür ortamındaki bakterinin bir kısmı alınarak plazmit DNA izolasyonu yapıldı.

#### **Plazmit DNA izolasyonu protokolü:**

1. Kültürden 1,5 ml alınarak 13200 rpm'de 5' santrifüj edildi. Bu işlem iki kez uygulandı ve süpernatant kısım atıldı.

2. 200 µl solüsyon 1 (Glikoz + Tris EDTA) eklendi. 2' buz üzerinde bekletildi.
3. 400 µl solüsyon 2 (SDS + NaOH) eklendi ve 5' alt-üst edildi.
4. 300 µl solüsyon 3 (KoAC + Asetik asit) eklendi ve 1' yavaşça sallandı.
5. 10' buz üstünde (0 °C) inkübe edildi.
6. 13200 rpm' de 5' santrifüj edildi. Burada iki faz oluştu.
7. Üst faz alındı ve yeni tüpe aktarıldı. Üzerine 500 µl etanol konuldu, 2' alt-üst edildi.
8. 5' 13200 rpm' de santrifüj edildi ve üst fazda kalan alkol döküldü.
9. 100 µl TE (10 mM Tris, 1 mM EDTA) tamponu eklendi.

### **Plazmit DNA İzolasyonunda Kullanılan Solüsyonlar**

#### **Solüsyon 1:**

- 50 mM Glukoz
- 1 M Tris HCL ( pH: 8.0 )
- 10 mM EDTA ( pH: 8.0 )

#### **Solüsyon 2:**

- 0.2 N NaOH
- %1 SDS

#### **Solüsyon 3:**

- 5 M KoAC
- Glasiyel Asetik Asit
- Distile su

## 2.6. Glukoz İçerikli Minimal Besiyerine Transfer İşlemi

**Tablo 3.** Glukoz içerikli sıvı besiyeri için kullanılan kimyasal maddeler

<b><u>Besiyeri için kullanılan kimyasal maddeler</u></b>	<b><u>Miktar (1000 ml için)</u></b>
Glukoz	10 g
K <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.39 g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> .HPO <sub>4</sub>	2.5 g
Mg(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0.097 g
MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	0.025 g
FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O	0.005 g
CaSO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0.001 g

Kimyasal maddeler 500 ml distile su içerisine eklendi ve manyetik karıştırıcı izerinde glukoz çözününceye kadar karıştırıldı. Glukoz tamamen çözündükten sonra karışımın izerine son hacim 1000 ml oluncaya kadar distile su eklendi ve 1-2 saat daha manyetik karıştırıcıyla karıştırılarak besiyeri homojen hale getirildi.

Hazırlanan besiyeri, her birine 250'şer ml olacak şekilde dört ayrı erlenmayere bölündü ve 115°C de 15 dk otoklav edildi. Otoklavdan ıkarılan besiyerleri +4°C de bir gece bekletildi.

Benzoik asit içerikli bakteri kültüründen 2 ml alınarak, glukoz içerikli sıvı besiyerine ekim yapıldı. İlk ekimin yapıldığı kültür I. nesil olarak adlandırıldı.

Ekimin yapıldığı ilk an (0. zaman)' da dahil olmak izere, her dört saatte bir kültür ortamından yaklaşık 2'şer ml örnekler alınarak, 600 nm'de spektrofotometrede absorbans ölçümü yapıldı ve bakteriler durağan faza kadar üretildi. Ölçüm yapılırken plastik küvetlerden birine kör olarak ekim yapılmamış glukoz içerikli besiyeri konuldu.

I. nesil bakteri kültürü durağan faza geldikten sonra bu kültürden 2 ml alınarak tekrar glukoz içerikli besiyerine ekim yapıldı. Ekim yapılan bu kültür ise II. nesil olarak adlandırıldı. Her 4 saatte bir aynı ölçümler yapılarak bakterilerin durağan faza ulaşması beklendi ve bu şekilde karbon kaynağı glukoz olan besiyerinde bakteriler V. nesile kadar üretildi.

Elde edilen bu dört nesil bakteri kültüründen plazmit DNA izolasyonu yapıldı.

## 2.7. Agaroz Jel Elektroforezi

İzole edilen plazmit DNA'lar agaroz jel elektrofrezine tabi tutuldu.

### **Agaroz jelin hazırlanması (% 1' lik) ve uygulanması protokolü:**

1. 1 gr agaroz 100 ml (1x) TBE (Tris-Borik asit-EDTA) tamponu içinde çözüldürüldü.

2. Bek alevinde yavaş yavaş ısıtılarak agarozun tamamen erimesi sağlandı.

3. Agaroz eridikten sonra eli yakmayacak bir sıcaklığa gelinceye kadar soğumaya bırakıldı.

4. İçine 10 µl etidyum bromür ilave edildi.

5. Hazırlanan agaroz, taraklar yerleştirildikten sonra elektrofrez tankına boşaltıldı ve katılaşımaya bırakıldı.

6. Katılaştıktan sonra tarak yavaşça çıkarıldı, jelin bulunduğu tank alındı ve içinde TBE tamponu bulunan elektrofrez ünitesine yerleştirildi. (Tampon, jelin üzerini kaplamalıdır).

7. Elektrofrez tabi tutulacak DNA örnekleri, yükleme (loading) tamponu ile karıştırıldı ve jelin içindeki çukurlara bir mikropipet yardımı ile boşaltıldı. Yükleme tamponu içerisinde Brom fenol blue adı verilen, jeldeki örneklerin ilerleyişini takip etmekte yararlanan bir boya maddesi ve DNA' nın tampon içinde çözünmeksizin yuvalara gömülmesini sağlayan Sukroz... vb. gibi maddeler bulunmaktadır.

8. Jelin üzeri bir kapakla örtüldü ve bir güç kaynağından elektrik akımı verildi. DNA numunesinin konulduğu tarafın katot kablosunun olduğu taraf olmasına dikkat edildi. Çünkü DNA anoda doğru hareket edecektir.

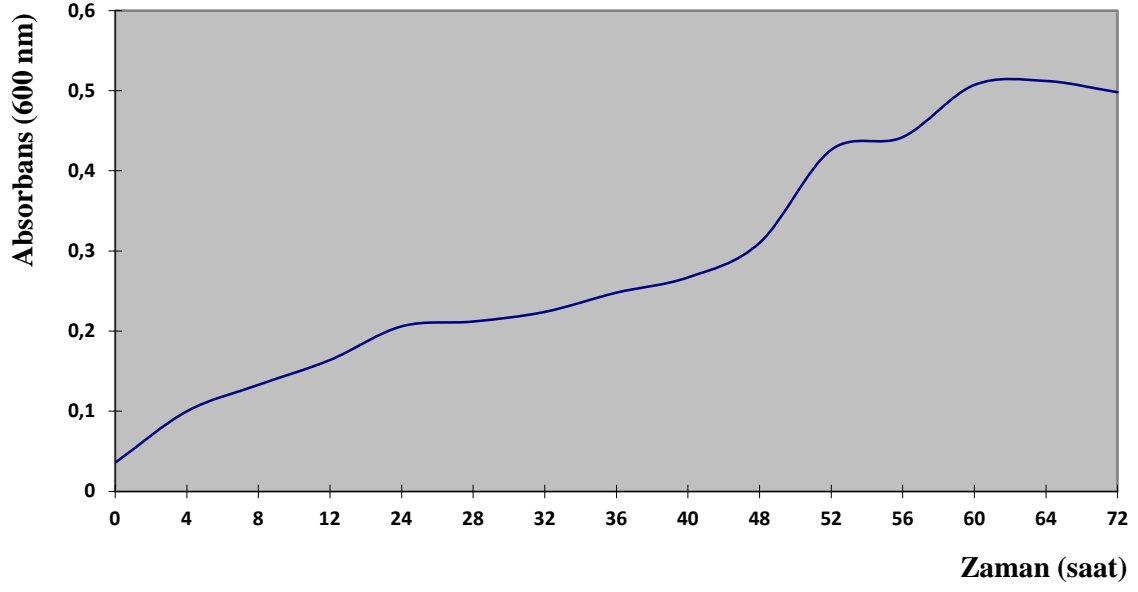
9. Güç kaynağı 50-75 mA' e ayarlandı ve jelin uzunluğuna bağlı olarak 30-90 dk akım verildi.

10. Bu işlemden sonra jel çıkarıldı ve UV ışığı altında DNA bantlarına bakıldı. Fragmentlerin molekül ağırlıklarına göre ayrıldığı görüldü.

### 3. BULGULAR

**Tablo 4.** Benzoik asit içerikli bakteri kültürünün 600 nm'deki absorbans değerleri  
(Körün absorbansı: 0.138)

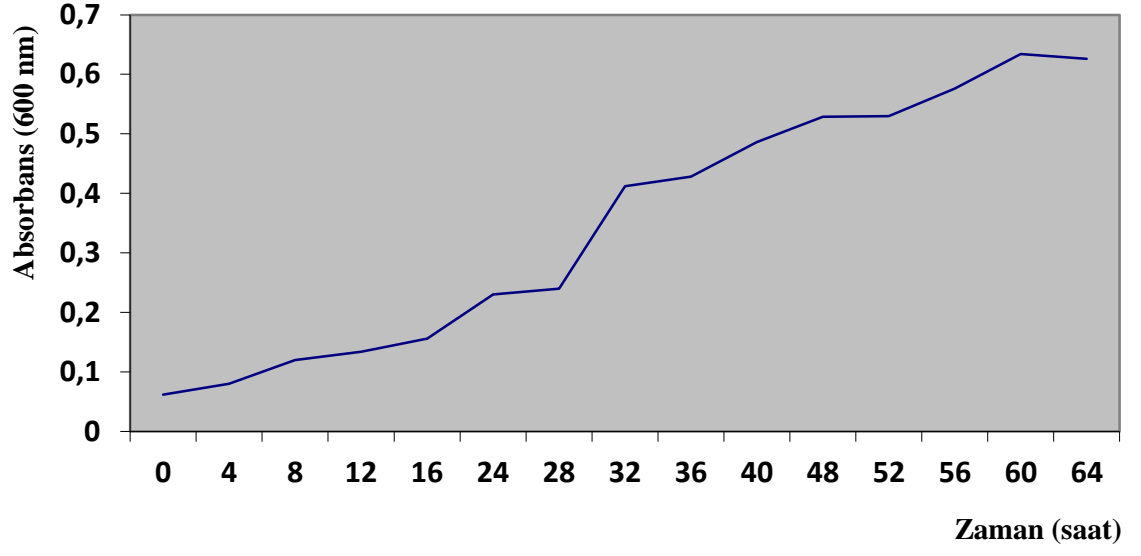
<u>Zaman (saat)</u>	<u>Absorbans ( 600 nm)</u>
0	0.036
4	0.100
8	0.133
12	0.164
24	0.206
28	0.212
32	0.224
36	0.248
40	0.267
48	0.310
52	0.426
56	0.442
60	0.507
64	0.512
72	0.498



**Şekil 5.** Benzoik asit içerikli besiyerindeki bakterilerin 600 nm'deki absorbans değerleri ile zamana bağlı gelişim basamakları

**Tablo 5.** Glukoz içerikli I. nesil bakteri kültürünün 600 nm’ deki absorbans değerleri  
( Körün absorbansı: 0.312 )

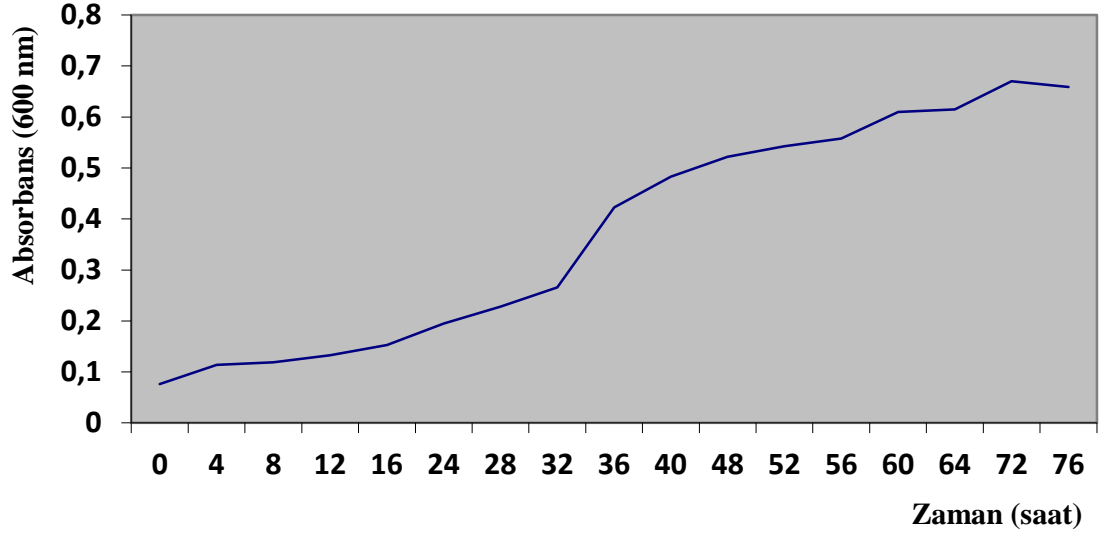
<b><u>Zaman (saat)</u></b>	<b><u>Absorbans ( 600 nm)</u></b>
0	0.062
4	0.080
8	0.123
12	0.134
16	0.156
24	0.230
28	0.240
32	0.412
36	0.428
40	0.486
48	0.529
52	0.538
56	0.576
60	0.634
64	0.626



**Şekil 6.** Glukoz içerikli I. nesil bakteri kültürünün 600 nm’ deki absorbans değerleri ile zamana bağlı gelişim basamakları

**Tablo 6.** Glukoz içerikli II. nesil bakteri kültürünün 600 nm' deki absorbands değerleri  
( Körün absorbandsı: 0.312 )

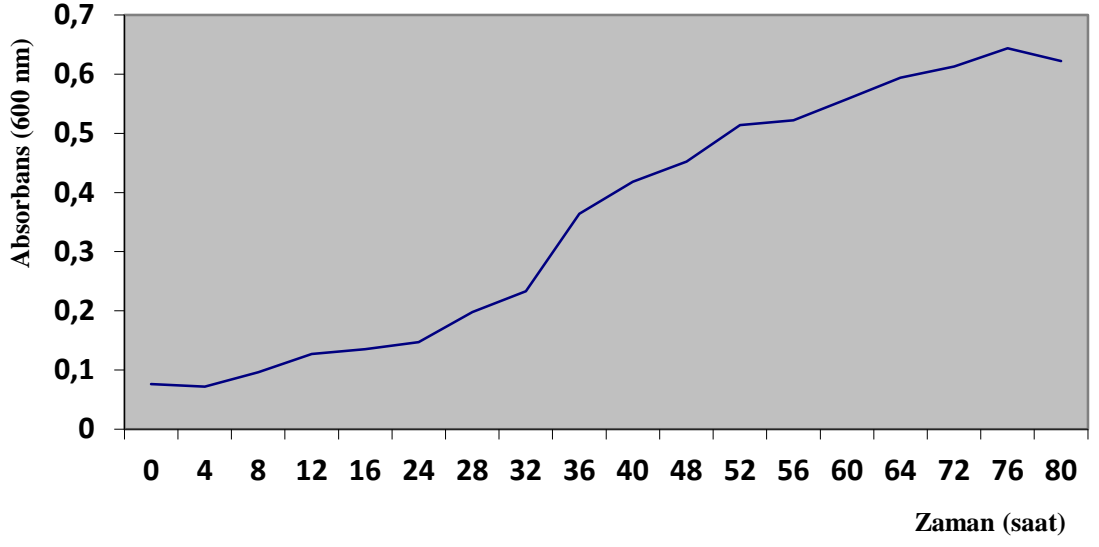
<u>Zaman (saat)</u>	<u>Absorbans ( 600 nm)</u>
0	0.076
4	0.114
8	0.119
12	0.133
16	0.153
24	0.195
28	0.228
32	0.266
36	0.423
40	0.483
48	0.522
52	0.543
56	0.558
60	0.610
64	0.615
72	0.670
76	0.659



**Şekil 7.** Glukoz içerikli II. nesil bakteri kültürünün 600 nm’ deki absorbans değerleri ile zamana bağlı gelişim basamakları

**Tablo 7.** Glukoz içerikli III. nesil bakteri kültürünün 600 nm’ deki absorbans değerleri  
( Körün absorbansı: 0.312 )

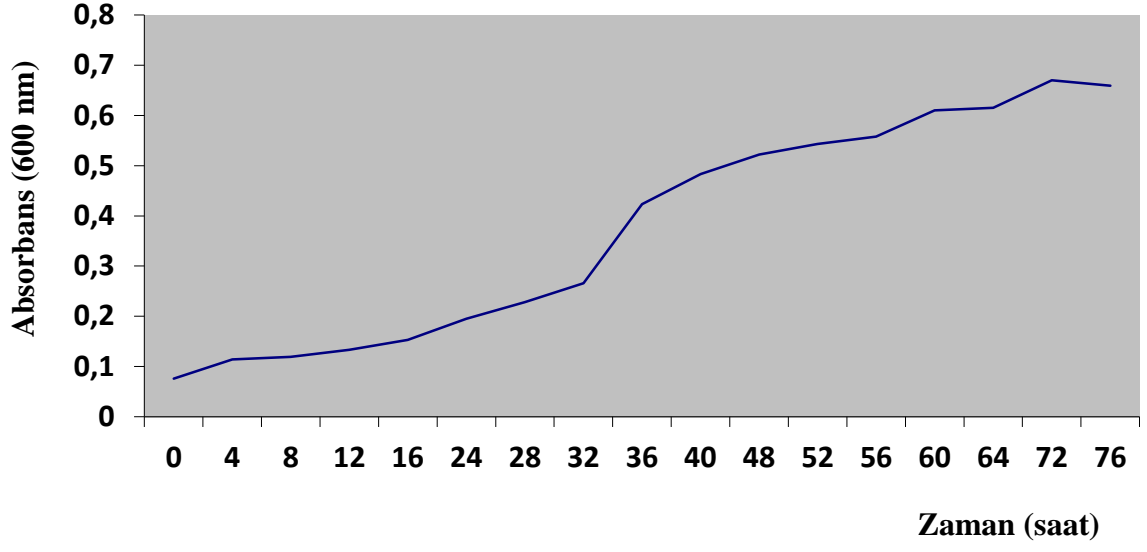
<u>Zaman (saat)</u>	<u>Absorbans ( 600 nm)</u>
0	0.072
4	0.096
8	0.127
12	0.135
16	0.147
24	0.198
28	0.233
32	0.364
36	0.418
40	0.452
48	0.514
52	0.522
56	0.558
60	0.594
64	0.613
72	0.638
76	0.644
80	0.622



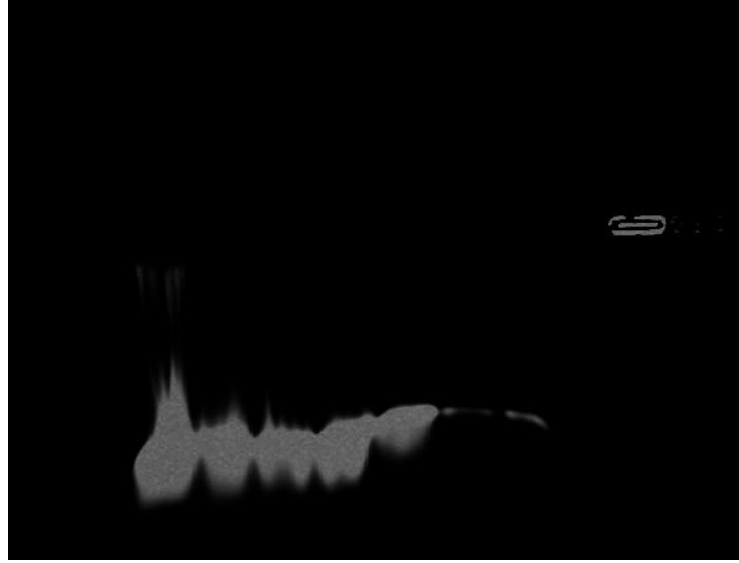
**Şekil 8.** Glukoz içerikli III. nesil bakteri kültürünün 600 nm' deki absorbans değerleri ile zamana bağlı gelişim basamakları

**Tablo 8.** Glukoz içerikli IV. nesil bakteri kültürünün 600 nm’ deki absorbans değerleri  
( Körün absorbansı: 0.312 )

<b><u>Zaman (saat)</u></b>	<b><u>Absorbans ( 600 nm)</u></b>
0	0.084
4	0.114
8	0.120
12	0.132
16	0.150
24	0.184
28	0.228
32	0.353
36	0.400
40	0.456
48	0.524
52	0.538
56	0.547
60	0.572
64	0.599
72	0.628
76	0.614



**Şekil 9.** Glukoz içerikli IV. nesil bakteri kültürünün 600 nm' deki absorbans değerleri ile zamana bağlı gelişim basamakları

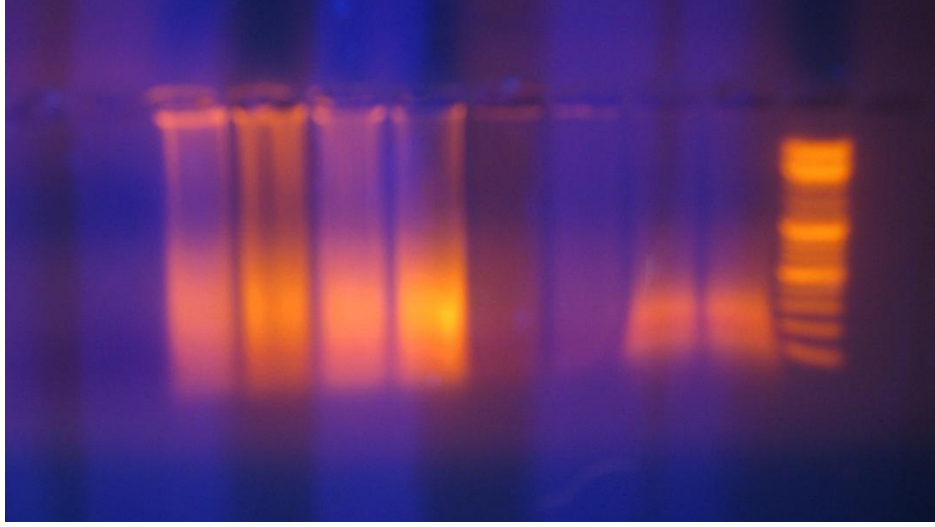


**Şekil 10.** Agaroz jelde yürütülen plazmit DNA bantları

Soldan sağa;

1. Kuyucuk: Benzoik asit içerikli besiyerinde üretilen bakterilerden izole edilen plazmit DNA.
2. Kuyucuk: Glukoz içerikli besiyerinde üretilen I. nesil bakterilerden izole edilen plazmit DNA.
3. Kuyucuk: Glukoz içerikli besiyerinde üretilen I. nesil bakterilerden izole edilen plazmit DNA.
4. Kuyucuk: Glukoz içerikli besiyerinde üretilen II. nesil bakterilerden izole edilen plazmit DNA.
5. Kuyucuk: Glukoz içerikli besiyerinde üretilen II. nesil bakterilerden izole edilen plazmit DNA.
6. Kuyucuk: Glukoz içerikli besiyerinde üretilen III. nesil bakterilerden izole edilen plazmit DNA.
7. Kuyucuk: Glukoz içerikli besiyerinde üretilen III. nesil bakterilerden izole edilen plazmit DNA.
8. Kuyucuk: Glukoz içerikli besiyerinde üretilen IV. nesil bakterilerden izole edilen plazmit DNA.

9. Kuyucuk: Glukoz içerikli besiyerinde üretilen IV. nesil bakterilerden izole edilen plazmit DNA.



**Şekil 11.** Agaroz jelde marker ile birlikte yürütülen plazmit DNA bandları.

Sağdan Sola;

1. Kuyucuk: Marker

2. Kuyucuk: Benzoik asit içerikli besiyerinde üretilen bakterilerden izole edilen plazmit DNA.

3. Kuyucuk: Benzoik asit içerikli besiyerinde üretilen bakterilerden izole edilen plazmit DNA.

4. Kuyucuk: Glukoz içerikli besiyerinde üretilen IV. nesil bakterilerden izole edilen plazmit DNA.

5. Kuyucuk: Glukoz içerikli besiyerinde üretilen IV. nesil bakterilerden izole edilen plazmit DNA.

6. Kuyucuk: Glukoz içerikli besiyerinde üretilen I. nesil bakterilerden izole edilen plazmit DNA.

7. Kuyucuk: Glukoz içerikli besiyerinde üretilen II. nesil bakterilerden izole edilen plazmit DNA.

8. Kuyucuk: Glukoz içerikli besiyerinde üretilen II. nesil bakterilerden izole edilen plazmit DNA.

9.Kuyucuk: Glukoz içerikli besiyerinde üretilen III. nesil bakterilerden izole edilen plazmit DNA.

#### 4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Dünya nüfusunun artması ile birlikte çoğalan insan faaliyetleri ve teknolojik gelişmelerle gerek endüstride gerekse günlük yaşamımızda yaygın olarak kullanılan organik kirleticilerin miktarı ve çeşitliliği, modern yaşamın gereksinimleri karşısında gün geçtikçe artmaktadır. Endüstrideki ilerlemeler ve gelişen tarım teknolojileri, petrol, petrol türevleri ve pestisitler gibi çeşitli kullanım alanlarına sahip olan birçok kirletici ajanın günlük hayatımıza girmesine neden olmaktadır. Bu organik kirleticilerin kullanımındaki artış, çevre sorunları ile birlikte ciddi sağlık sorunlarını da beraberinde getirmektedir (Telefoncu, 1995).

Organik kirleticilerden biri olan benzoik asidin çeşitli çevrelerde birikimi toksik etki yaparak canlıların yaşamını tehdit etmektedir (Reiner, 1971; Wang ve ark., 2006). Benzoik asit ile kirlenmiş olan hava, toprak ve su gibi çevrelere uygulanan fiziksel ve kimyasal dekontaminasyon metotları tam ve etkili bir çözüm getirmekten uzak gözükmektedir (Kahraman ve ark., 2005).

Kirliliğe sebep olan maddelerin daha etkili bir şekilde uzaklaştırılabilmesi için zorlu çevre şartlarında gelişimini sürdürebilen ve çok çeşitli substratları kullanabilen organizmaların elde edilmesine çalışılmaktadır (Bruins ve ark., 2000b, Diaz 2004).

Yayınlanmış çalışmalardan hareketle, hem toprak hem de deniz ortamlarında en önemli hidrokarbon-parçalayan bakterilerin *Achromobacter*, *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Flavobacterium*, *Nocardia*, *Pseudomonas* ve korineformlar oldukları tespit edilmiştir (Leahy ve ark., 1990).

Bu çalışmada *Pseudomonas putida*'yı kullanmamızın en önemli nedeni bu bakterinin toksik özellikteki kimyasalların biyolojik yıkımını gerçekleştirebilmesi ve solventlere karşı en dirençli bakteriler arasında olmasıdır.

Yapılan bir çalışmada *Pseudomonas* suşlarının biyodegradasyon özelliklerinin plazmit DNA kaynaklı olduğu belirtilmiştir (Bruins ve ark., 2000a).

*Pseudomonas putida* ve diğer *Pseudomonas*lar birçok kimyasal maddeyi ayrıştırabilecek plazmit kaynaklı enzimlere sahiptirler. Böyle enzimlerin sayısı 10'dan fazla değildir. Örneğin; SAL, NAH, ASL ve TOL plazmitleri, sıra ile salisilat, naftalin, alkil benzen sülfonat ve tolueni ayrıştırarak katekole çevrilir ve sonra da plazmitlerce

kodlanan enzimler tarafından asetaldehite ve pirüvatlara dönüştürülür (Geçkil ve ark., 2003).

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

Günümüzde çevre ile yapılan çalışmalarda en büyük hedef, çevreye bırakılan zararlı maddelerin uzaklaştırılması için yapılan çalışmalardır. Bunlar kimyasal olarak yapılabildiği gibi biyolojik olarak da yapılabilmektedir. Biyolojik olarak yapılan çalışmalar, düşük maliyetli oluşları ve doğa dostu uygulama prosesleri olduğundan dolayı daha çok tercih edilirler (Santacruz ve ark., 2005).

Çalışmamızın temel amacı benzoik asidin yıkımını sağlayan plazmitlerin stabilitelelerini belirlemektir. Bu kapsamda *Pseudomonas putida* NRRL B-13 suşu verimli bir şekilde benzoik asidi karbon kaynağı olarak kullanmakta ve böylece biyolojik yıkımını sağlamaktadır. Elde edilen bulgularda da görüldüğü gibi bakteri çoğalması için karbon kaynağı olarak sadece benzoik asit kullanıldığında plazmit DNA izolasyonu sonucunda yürütülen agaroz jel elektroforezinde, DNA bandları oldukça belirgin bir şekilde gözlenmektedir (Şekil 10). Böylece *Pseudomonas putida* NRRL B-13 suşunun benzoik asidin yıkımını sağlayan enzimleri kodlayan plazmite sahip olduğunu desteklemektedir. Ayrıca, karbon kaynağı olarak sadece benzoik asit kullanıldığında bakteri çoğalması da bu durumu kuvvetle desteklemektedir (Şekil 5). *Pseudomonas putida* NRRL B-13 suşunun, karbon kaynağı benzoik asit olan besiyerinden, karbon kaynağı olarak sadece glukoz içeren besiyerine ekimi yapıldığında bakteri çoğalması sağlanmakta ve yapılan plazmit DNA izolasyonu sonucunda yürütülen agaroz jel elektroforezinde DNA bandları izlenmekte fakat benzoik asit içerikli bandlara göre daha zayıf olduğu gözlenmektedir (Şekil 10-11). Bu durum glukoz içerikli besiyerinde plazmit DNA miktarında azalma olduğunu göstermektedir. Bakteri, karbon kaynağı benzoik asit olan besiyerinde benzoik asidin yıkımını sağlayabilmek için gerekli enzimleri kodlayan genleri içeren plazmitin kopya sayısını artırmıştır. Bu nedenle, benzoik asit içerikli besiyerinden izole edilen plazmit DNA’nın agaroz jeldeki band görüntüsü daha belirgindir. Bakteri, karbon kaynağı glukoz olan besiyerine aktarıldığında ortamda benzoik asit bulunmadığı için benzoik asidin yıkımını

sağlayan enzimlere de ihtiyaç yoktur. Bu nedenle de, bakteri benzoik asidin yıkımı için gerekli enzimleri kodlayan genleri içeren plazmitin kopya sayısını her jenerasyon sonrasında giderek azaltmıştır. Plazmit DNA azalması II. ve III. bakteri nesillerinde giderek daha belirgin şekilde görülmektedir ( Şekil 10-11). Karbon kaynağı olarak sadece glukoz içeren IV. nesilde ise herhangi bir plazmit DNA bandına rastlanmamaktadır. Bu durum bize, benzoik asit içerikli ortamdan glukoz içerikli ortama ekim yapıldığında, plazmit stabilitesinde de zayıflama olduğunu göstermektedir. Çünkü plazmit DNA miktarı glukoz içerikli besiyerinde IV. nesile kadar azalmaktadır ve IV. nesilde stabilitesini kaybetmektedir.

Marker ile birlikte yürütülen agaroz jel elektroforezinde, plazmit DNA bandlarının büyüklüğü 1375 bp olarak belirlendi. Bu güne kadar yapılan çalışmalarda, *Pseudomonas putida* suşuna ait bu büyüklükte bir plazmit DNA keşfedilmemiştir. Bu durumda, benzoik asidin yıkımında rol alan enzimleri kodlayan genlere sahip bu plazmitin yeni bir plazmit olduğu muhtemeldir.

Son zamanlarda biyoteknoloji alanındaki araştırmalar mikroorganizmalar yardımı ile organik maddelerin parçalaması ve yeni ürünlerin elde edilmesi esasına dayanmaktadır. Böylece hem çevre kirliliği azaltılacak hem de insanların yaşamı için yararlı ürünlerin elde edilmesi sağlanmış olacaktır.

Bu çalışmadan elde edilen verilerin kullanılması benzoik asit ile kirlenmiş olan çevrelerin biyo-iyileştirilmesinde önemli rol oynayabilir.

## KAYNAKÇA

- Baumann, L., Baumann, P. Mandel, M. and Allen, R.D. (1972). Taxonomy of Aerobic Marine Eubacteria. *J. Bacteriol.*, 110(1): 402-429.
- Bruins, M.R., Kapil, S. and Oehme, F.W. (2000a) *Pseudomonas pickettii*: A Common Soil and Groundwater Aerobic Bacteria with Pathogenic and Biodegradation Properties. *Ecotox. Environ. Safe.*, 47: 105-111.
- Bruins, M.R., Kapil, S. and Oehme, F.W. (2000b). Microbial Resistance to Metals in the Environment. *Ecotox. Environ. Safe.*, 45: 198-207.
- Cabanes, F.J., Alonso, J.M., Castella, G., Alegre, F., Domingo, M. and Pont, S. (1997) Cutaneous Hyalohyphomycosis Caused by *Fusarium solani* in a Loggerhead Sea Turtle (*Caretta caretta* L.). *J. Clin. Microbiol.*, 35(12): 3343-3345.
- Carson, L.A., Favero, M.S., Bond, W.W. and Petersen, N.J. (1973) Morphological, Biochemical and Growth Characteristics of *Pseudomonas cepacia* from Distilled Water. *Appl. Microbiol.*, 25(3): 476-483.
- Chang, B.V., W, W.B. and Yuan, S.Y. (1997) Biodegradation of Benzene, Toluene and Other Aromatic Compounds by *Pseudomonas* sp. D8. *Chemosphere.*, 35(12): 2807- 2815.
- Chayabutra C., Ju L. K., Degradation of n- hexadecane and its metabolites by *Pseudomonas aeruginosa* under microaerobic and anaerobic denitrifying conditions. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66, 493-498, 2000.
- Cowan, S.T., Holt, J.G., Liston, J., Murray, R.G.E., Niven, C.F., Ravin, A.W. and Stanier, R.Y. (1974) *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, Buchanan, R.E. and Gibbons, N.E. (co-eds.), 8th ed., The Williams and Wilkins Company., Baltimore, London, Part 7, p217-243.
- Çakmakçı, L. ve Karahan, A. G., 1995. Mikrobiyolojiye Giriş Kitabı, Ankara.
- Çotuk, A., 2003. Genel Mikrobiyoloji Laboratuvar Yöntemleri. Nobel Tıp Kitapevleri, Nobel Matbaacılık, İstanbul, 138s.
- Diaz, E. (2004) Bacterial Degradation of Aromatic Pollutants: A paradigm of Metabolic Versality. *Int. Microbiol.*, 7:173-180.
- Farrell, R. L., Rhodes, P. L. and Aislabie, J. (2003) Toluene-Degrading Antarctic *Pseudomonas* Strains from Fuel-Contaminated Soil. *Biochem. Bioph. Res. Co.*, 312: 235-240.
- Feist C. F., Hegeman G. D. (1969). Phenol and benzoate metabolism by *Pseudomonas putida*; regulation of tangential pathway. *Journal of Bacteriology*, 100: 869-877.
- Filali, B.K., Taoufik, J., Zeroual, Y., Dzairi, F.Z., Talbi, M. and Blaghen, M. (2000). Waste Water Bacterial Isolates Resistant to Heavy Metals and Antibiotics. *Curr. Microbiol.*, 41: 151-156.

- Fish P. A., Webster D. A., and Stark B. C. (2000). *Vitreoscilla* hemoglobin enhances the first step in 2, 4- dinitrotoluene degradation in vitro and at low aeration in vivo. J. Mol. Cat.B: Enz., 9, 75-82.
- Fuller, A.T. and Mellows, G. (1971) Pseudomonic Acid: An Antibiotic Produced by *Pseudomonas fluorescens*. Nature., 234: 416-417.
- Geckil, H., Gencer, S., Kahraman, H., Erenler, S. O. (2003). Genetic engineering of *Enterobacter aerogenes* with *Vitreoscilla* hemoglobin gene: Cell growth, survival, and antioxidant enzyme status under oxidative stress. Res. Microbiol., 154, 425-431.
- Güç E., Bayat O., 2010. Kolemanit içeriğindeki arseniğin biyoliç ile uzaklaştırılması. Yüksek Lisans Tezi. Çukurova Üniversitesi.
- Hassen, A., Saidi, N., Cherif, M. and Boudabous, A. (1998b) Effects of Heavy Metals on *Pseudomonas aeruginosa* and *Bacillus thuringiensis*. Bioresource Technology., 65: 73-82.
- Hirano, S.S. and Upper, C.D. (2000) Bacteria in the Leaf Ecosystem with Emphasis on *Pseudomonas syringae* a Pathogen, Ice Nucleus and Epiphyte. Microbiol. Mol. Biol. R., 64(3): 624-653.
- Hollway B. W., Krishnapillai V., Morgan A. F. (1969). Genetic of *Pseudomonas*. Bacteriological Reviews, 33: 419-443.
- Kahraman H., Geçkil H. (2005). Benzoik asidin *Vitreoscilla* hemoglobin geni aktarılmış *Pseudomonas aeruginosa* tarafından yıkımı. F.Ü. Fen ve Mühendislik Bilimleri Dergisi, 17(2):342-348.
- Kanner, D., Gerber, N.N. and Bartha, R. (1978) Pattern of Phenazine Pigment Production by a Strain of *Pseudomonas aeruginosa*. J. Bacteriol., 134(2): 690-692.
- Kemp M. B., Hegeman G. D. (1968). Genetic control of  $\beta$ -Ketoacid pathway in *Pseudomonas aeruginosa*. Journal of Bacteriology, 96: 1488-1499.
- Keskin, D. ve Ekmekçi, S. (2003) *Pseudomonas* türlerinin gıdalardan izolasyon ve tanımlanmasında kullanılan besiyerleri. Mikrobiyoloji Dergisi., 1(8): 29-33.
- Kotsal, J., Sushanek, M., Klierova, H., Demnerova, K., Kralova, B. and McBeth, D.L. (1998) *Pseudomonas* C12B, an SDS Degrading Strain, Harbours a Plazmid Coding for Degradation of Medium Chain Length n-Alkanes. Int. Biodeter. Biodegr., 42: 221-228.
- Kukor J. J., Olsen R. H. Ballau D. P. (1988). Cloning and expression of the *catA* and *catBC* gene clusters from *Pseudomonas aeruginosa* PAO. Journal of Bacteriology, 170:4458-4465.

- Leahy, J. G and Colwell, R. R. (1990) Microbial degradation of hydrocarbons in the Environment. *Microbiol. Res.*, 54(3): 305-315.
- Leahy J. G., Tracy K. D., Eley M. H., Degradation of mixtures of aromatic and chloroaliphatic hydrocarbons by aromatic hydrocarbon- degrading bacteria. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 43, 271- 276, 2003.
- Meyer, J.M. and Hohnadel, D. (1990) Pyoverdin-Facilitated Iron Uptake in *Pseudomonas aeruginosa*: Immunological Characterization of the Ferripyoverdin Receptor. *Mol. Microbiol.*, 4: 1401-1405.
- Morales G., Linares J. F., Beloso A., Ablar J. P., Martines J. L., Rojo F. (2004). The *Pseudomonas putida* Crc global regülätör controls the Expression of genes from several chromosomal catabolic pathways for aromatic compounds. *Journal of Bacteriology*, 186: 1337-1344.
- Müşteri Y., Sarı M., 2008. Benzoik asidin *Pseudomonas aeruginosa* tarafından biyolojik yıkımının optimizasyonu. Yüksek Lisans Tezi. Cumhuriyet Üniversitesi.
- Ornston L. N. (1966). The conversion of catechol and protocatechuate to  $\beta$ -ketoadipate by *Pseudomonas putida*. *The journal of Biological Chemistry*, 241: 3800-3810.
- Pazarlıoğlu, N., 1996, Biodegradation of phenol from industrial wastewater by using immobilized *Pseudomonas putida* DSM50026, Ph.D. Thesis, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 104 s.
- Pekcan G., Aktaş H., 2005. Benzoik asit bileşiklerinin pK değerlerinin UV spektroskopisi yoluyla tayini. Yüksek Lisans Tezi.
- Pine, H.S., 1987. *Organic Chemistry*, Mc Graw Hill Companies Inc., Fifth Edition, NewYork, pp: 667-675.
- Reiner A. M. (1971). Metabolism of benzoic acid by bacteria:3, 5-cyclohexadiene-1,2-diol-1-carboxylic acid is an intermadiate in the formation of catechol. *Journal of Bacteriology*, 108: 89-94.
- Sadhukhan, P.C., Ghosh, S., Chaudhuri, J., Ghosh, D.K. and Mandal, A. (1997) Mercury and Organomercurial Resistance in Bacteria Isolated from Freshwater Fish of Wetland Fisheries Around Calcutta. *Environ. Pollut.*, 97(1-2): 71-78.
- Sandrin, T.R. and Maler, R.M. (2003) Impact of Metals on the Biodegradation of Organic Pollutants. *Environment Health Perspectives.*, 111(8): 1093-1101.
- Santacruz G., Bandala, E., R., Torres, L., G., 2005, Chlorinated pesticides (2,4-D and DDT) biodegradaton at high concentratons using immobilized *Pseudomonas flourescens*, *Journal of Enviromental Science and Health Part B*, 40: 571-583.
- Silver, S. (1992) Plasmid-Determined Metal Resistance Mechanisms: Range and Overview. *Plasmid.*, 27: 1-3.
- Telefoncu A., “Biyoteknoloji”, *Ege Üniversitesi Yayınlar.*, Bornova, İzmir, (1995).

- Vachee, A., Mossel, D.A.A. and Leclerc, H. (1997) Antimicrobial Activity Among *Pseudomonas* and Related Strains of Mineral Water Origin. *J. Appl. Microbiol.*, 83: 652-658.
- Wang C. L., You S. L. (2006). Purification and characterization of a novel catechol 1,2-dioxygenase from *Pseudomonas aeruginosa* with benzoic acid as a source. *Process Biochemistry*, 41: 1594-1601.
- Whyte, L.Y., Bourbonniere, L. and Greer, C.W. (1997) Biodegradation of Petroleum Hydrocarbons by Psychrotrophic *Pseudomonas* Strains Possessing Alkane (alk) and Naphthalene (nah) Catabolic Pathways. *Appl. Environ. Microbiol.*, 63(9): 3719- 3723.

## ÖZGEÇMİŞ

**Handan SARAÇ**  
**Cumhuriyet Üniversitesi,**  
**Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü**

### KİŞİSEL BİLGİLER

Adres İstasyon cad. Örtülüpınar mah. Amcalar apt. Kat:7 No:13 SİVAS  
Tel 0506 381 66 62  
E-mail handantdn@hotmail.com  
Medeni hali Evli  
Uyruğu T.C.  
Doğum tarihi 29.07.1987  
Doğum yeri SİVAS

### EĞİTİM

Yüksek lisans Cumhuriyet Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü,  
Mezuniyet yılı: Devam ediyor  
Lisans Cumhuriyet Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü,  
Mezuniyet yılı: 2010  
Lise Sivas Kongre Lisesi (Süper Lise) 2005

### YABANCI DİL BİLGİSİ

İngilizce, İyi derecede

### UZMANLIK ALANLARI

Biyoteknoloji, Moleküler Biyoloji

### BAŞARILAR / ÖDÜLLER

2010 yılı Biyoloji Bölüm ikinciliği

### BİLDİRİLER

“TÖDÜRGE GÖLÜ’NDEKİ TATLI SU KEFALİ (*SQUALIUS CEPHALUS* L.,1758)’NİN BESİN

KOMPOZİSYONU VE BESLENME ALIŞKANLIKLARI”, Ulusal Su Günleri Sempozyumu, Elazığ, 2009

**ARAŐTIRMA PROJELERİ & ARAŐTIRMA DENEYİMİ**

“*Pseudomonas putida* NRRL B-13 suşu tarafından benzoik asidin biyolojik yıkımını sağlayan enzimleri kodlayan plazmitlerin stabilitelerinin belirlenmesi” projesi, 2011-Devam ediyor, CÜBAP tarafından desteklenmiőtir.

**ÜYE OLUNAN KURULUŐLAR**

Yükseköğretim Kurulu (YÖK) Ulusal Tez Merkezi, TÜBİTAK Araőtırmacı Bilgi Sistemi

**İLGİ ALANLARI, HOBİLER**

Kitap okumak, yüzmek