

T.C.
MUĞLA SITKI KOÇMAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ÇEVRE BİLİMLERİ ANABİLİM DALI

MUĞLA BÖLGESİNDEN ELDE EDİLEN TOPRAK-
GÜBRE KARIŞIMLARINDAN İZOLE EDİLEN
MİKROORGANİZMALARDA ANTİBİYOTİK
DİRENÇLİLİK DEĞİŞİMİNİN TESPİT

YÜKSEK LİSANS TEZİ

SAADAT SAMADOVA

OCAK 2023
MUĞLA

T.C.
MUĞLA SITKI KOÇMAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ÇEVRE BİLİMLERİ ANABİLİM DALI

**MUĞLA BÖLGESİNDEN ELDE EDİLEN TOPRAK-
GÜBRE KARIŞIMLARINDAN İZOLE EDİLEN
MİKROORGANİZMALARDA ANTİBİYOTİK
DİRENÇLİLİK DEĞİŞİMİNİN TESPİTİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

SAADAT SAMADOVA

OCAK 2023
MUĞLA

MUĞLA SITKI KOÇMAN ÜNİVERSİTESİ

Fen Bilimleri Enstitüsü

TEZ ONAYI

SAADAT SAMADOVA tarafından hazırlanan MUĞLA BÖLGESİNDEN ELDE EDİLEN TOPRAK+GÜBRE KARIŞIMLARINDAN İZOLE EDİLEN MİKROORGANİZMALARDA ANTİBİYOTİK DİRENÇLİLİK DEĞİŞİMİNİN TESPİTİ başlıklı tezinin, 12/01/2023 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Çevre Bilimleri Anabilim Dalı'nda yüksek lisans derecesi için gerekli şartları sağladığı oybirliği/oyçokluğu ile kabul edilmiştir.

TEZ SINAV JURİSİ

Prof. Dr. Aysel UĞUR (Jüri Başkanı)

İmza

Dış Hekimliği Fakültesi, Temel Bilimler

Bölümü, Gazi Üniversitesi, Ankara

Prof. Dr. Özgür CEYLAN (Danışman)

İmza:

Ula Ali Koçman MYO, Gıda İşleme Bölümü,

Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Muğla

Doç.Dr. Çağdaş GÖNEN (Üye)

İmza:

Alternatif Enerji Kaynakları Teknolojisi Programı,

MYO, Muğla

ANA BİLİM DALI BAŞKANLIĞI ONAYI

Doç.Dr. Çağdaş GÖNEN

İmza:

Çevre Bilimleri Ana Bilim Dalı Başkanı,

Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Muğla

Prof. Dr. Özgür CEYLAN (Danışman)

İmza:

Ula Ali Koçman MYO, Gıda İşleme Bölümü,

Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Muğla

Savunma Tarihi: 12/01/2023

Tez çalışmalarım sırasında elde ettiğim ve sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgelerin tarafımdan bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde edildiğini; akademik ve bilimsel etik kurallarına uygun olduğunu beyan ederim. Ayrıca, akademik ve bilimsel etik kuralları gereği bu tez çalışması sırasında elde edilmemiş başkalarına ait tüm orijinal bilgi ve sonuçlara atıf yapıldığını beyan ederim.

Saadat Samadova

12/01/2023

(İmza)

ÖZET

Yüksek lisans Tezi

MUĞLA BÖLGESİNDEN ELDE EDİLEN TOPRAK-GÜBRE KARIŞIMLARINDAN İZOLE EDİLEN MİKROORGANİZMALARDA ANTİBİYOTİK DİRENÇLİLİK DEĞİŞİMİNİN TESPİTİ

Saadat SAMADOVA

Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Çevre Bilimleri Anabilim Dalı

Danışman : Prof. Dr. Özgür CEYLAN

Tarımsal üretimde yüksek verim elde etmek için gübre uygulamaları zorunluluk olarak görülmektedir. Ancak uygulanan gübrelerin miktarları, çeşitleri ve uygulama zamanlarının farklılık göstermesi ve bu alandaki bilgi yetersizliği nedeniyle çevreyi olumsuz olarak etkilenmektedir. Yapılan yalnız gübre uygulamalarıyla topraklarda besin maddesi dengesizliği, mikroorganizma etkinliğinin bozulması, ağır metal birikimi vb. sorunlar oluşturmaktadır. Bu tez çalışmasında, gübrelerin bilinçsiz ve fazla kullanımlarının oluşturacağı çevre ve sağlık sorunları, mikroorganizmalar üzerinde etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

Bu çalışmada Muğla ilinin 3 farklı bölgesinden elde edilen toprak örneklerinden *Bacillus spp.* ve *Pseudomonas spp.* bakterileri izole edilmiştir. Bakterilerin izolasyonu ilk önce toprak örneklerinden daha sonra toprak+gübre karışımlarından (1/6, 1/10 ve 1/12), 3 farklı bekleme süresi (1.,7. ve 30. gün) sonrasında yapılmıştır. Toprak+gübre karışımı için amonyum sülfat (kimyasal gübre) ve leonardit (organik gübre) kullanılmıştır. *Bacillus* suşlarının izolasyonunda sodyum asetatlı Nutrient Broth, *Pseudomonas* suşlarının izolasyonunda ise supplementli (SR103E) selektif *Pseudomonas* Agar kullanılmıştır. İzolatların morfolojik özellikleri

(koloni rengi, koloni büyüklüğü, koloni tipi) ve Gram boyama test sonuçlarına göre gruplandırılma yapılmıştır. Ön identifikasyon testleri sonucunda 8 adet izolatan *Bacillus* ve 3 adet izolatan *Pseudomonas* cinsine ait olduğu belirlenmiştir. Her bir toprak örneğinden ve toprak+gübre karışımlarından birer *Bacillus* spp. ve birer *Pseudomonas* spp. bakteri suşu seçilmiştir. Çalışmanın antimikrobiyal aktivite kısmına fenotipik identifikasyonları API 20NE test kiti ile belirlenmiş olan 3 adet *Pseudomonas* spp. ve API 50CH ve API 20E test kitleri ile belirlenmiş 3 adet *Bacillus* spp. ile devam edilmiştir. İdentifikasyon testleri neticesinde çalışmaya alınan *Pseudomonas* türleri *P.fluorescens* ve *P.putida* (2 adet), *Bacillus* türleri ise *B.lentus*, *B.subtilis* ve *B. licheniformis*'dir.

Antibiyotik duyarlılık testlerinin belirlenmesinde *Bacillus* spp'ler için Penicillin (P), Oxacillin (OX), Streptomycin (S), Vancomycin (VA), Ampicillin (AM), *Pseudomonas* spp.'ler için Mezlocillin (MEZ), Trimethoprim sulfamethoxazole (SXT), Gentamicin (GN), Aztreonam (ATM), Ceftazidime (CAZ) antibiyotik diskleri kullanılmıştır. Bakterilerin antibiyotik dirençlilik durumları CLSI M39-A4 standartlarına göre belirlenmiştir.

Saf toprak, toprak+leonardit ve toprak+amonyum sülfat karışımlarından elde edilen *B. lentus*, *B. subtilis* ve *B. licheniformis* suşlarının Penicilin, Oxacillin, Ampicillin antibiyotiklerine karşı karışım oranı ve bekleme süresi sonrası direnç değişimi tespit edilememiştir. *B.subtilis* suşunun Streptomycin antibiyotiğine karşı dirençlilik değişimi görülmezken, *B.lentus* suşunda 1/6 ve 1/10 karışımında 30. günde dirençlilikte artış tespit edilmiştir. *B. licheniformis* suşunda ise sadece 1/6 karışımında 30.günde Streptomycin antibiyotiğine karşı dirençlilik artmıştır. *B. lentus* ve *B.licheniformis* suşlarının Vancomycin antibiyotiğine karşı 1/6 karışım oranında dirençlilik artışı görülmüştür.

Toprak+amonyum sülfat karışımından elde edilen *B. subtilis* ve *B. lentus* suşlarının Vancomycin antibiyotiğine karşı tüm oran ve bekleme süreleri sonunda dirençli oldukları, *B. licheniformis* suşunun ise tüm oranlarda 1. gün orta seviyede olan dirençlilik 7. ve 30. günde dirençli oldukları tespit edilmiştir. *B. lentus* suşunun Streptomycin antibiyotiğine karşı amonyum sülfat karışımında tüm oran ve bekleme süresi sonrası değişiklik görülmezken, *B. subtilis* suşunun 1/12 karışımında 30. günde, *B. licheniformis* suşunun ise 1/10 ve 1/12 karışımında 30. günde dirençlilikte artış görülmüştür.

Toprak+leonardit karışımlarından elde edilen *P. fluorescens*, *P. putida* (1) ve *P. putida* (2) suşlarının Mezlocillin, Aztreonam ve Ceftazidime antibiyotiklerine karşı dirençli, toprak+amonyum sülfat karışımlarından elde edilenlerde ise Ceftazidime ve Trimethoprim Sulfahoxazole antibiyotiklerine karşı dirençli oldukları, gübre oranı ve bekleme süresinin etkisi olmadığı tespit edilmiştir.

Toprak+leonardit karışımından elde edilen *P.fluorescens* suşunda trimethoprim sulfamethoxazole antibiyotiğine karşı tüm oran ve bekleme süreleri sonunda etki görülmezken, *P. putida* (1) suşu 1/6 oranında dirençlilik kazanmış, *P.putida* (2) suşu ise trimethoprim sulfamethoxazole antibiyotiğine karşı her 3 oranda bekleme süresi sonunda dirençlilik azalmıştır. *P. fluorescens* suşlarının toprak+leonardit karışımlarında gentamycin antibiyotiğine karşı karışım oranı ve bekleme süresi sonunda dirençliliği artarken, *P. putida* (1) ve (2) suşlarını ise gentamycin antibiyotiğine karşı karışım oranı ve bekleme süresi sonunda orta seviyede dirençli bulunmuştur.

Toprak+amonyum sülfat karışımından elde edilen *P.flourescens* ve *P.putida* (2) suşlarında mezlocillin antibiyotiğine karşı her 3 oranda, *P.putida* (1) suşunda ise sadece 1/6 oranında 30. günde dirençlilik artışı tespit edilmiştir. *P. flourescens* suşu Aztreonam antibiyotiğine karşı her 3 oranda ve bekleme süreleri sonucunda dirençli iken, aynı suşun Gentamycin antibiyotiğine karşı karışım oranı ve bekleme süresi sonrası dirençliliğinin azaldığı tespit edilmiştir. Bu durum *P.putida* suşları içinde benzer olup, toprak+amonyum sülfat karışımında karışım oranı bekleme süresi sonrası Gentamycin antibiyotiğine karşı dirençlilikleri zayıflamıştır. *P.putida* (1) ve (2) suşları Aztreonam antibiyotiğine karşı farklı duyarlılık göstermiş olup, *P.putida* (1) karışım oranı ve bekleme süresi sonrasında duyarlı bulunurken, *P.putida* (2) suşu dirençli bulunmuştur.

Anahtar kelimeler: Pseudomonas, Bacillus, Leonardit, Amonyum sülfat, Antibiyotik dirençlilik



ABSTRACT

Master Thesis

DETECTION OF ANTIBIOTIC RESISTANCE CHANGE IN MICROORGANISMS ISOLATED FROM SOIL-FERTILIZER MIXTURES OBTAINED FROM MUĞLA REGION

Saadat SAMADOVA

Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi

Institute of Science

Department of Environmental Sciences

Advisor : Prof. Dr. Özgür CEYLAN

To reach a high level of agricultural production efficiency, fertilizer applications are deemed necessary. However, the ecosystem is negatively impacted by the varying amounts, types, and application timings of applied fertilizers and the paucity of information in this subject. With improper fertilizer applications, nutritional imbalance in the soil, decrease of microbial activity, buildup of heavy metals, etc. might cause issues. The purpose of this thesis is to explore the impact of unintentional and excessive fertilizer use on environmental and health issues and microorganisms.

Bacillus spp. and *Pseudomonas spp.* bacteria have been isolated for this study. Bacteria were first extracted from soil samples, followed by soil-fertilizer mixes (1/6, 1/10, and 1/12) after three different waiting periods (1st, 7th and 30th days). For the soil+fertilizer mixture, ammonium sulfate (a chemical fertilizer) and leonardite (an organic fertilizer) were utilized. *Bacillus* strains were isolated using Nutrient Broth supplemented with sodium acetate, whilst *Pseudomonas* bacteria were isolated using selected *Pseudomonas* Agar supplemented (SR103E). The isolates were categorized based on their morphological characteristics (colony color, colony size, and colony type) and Gram stain test outcomes. The early identification tests revealed that 8 of the isolates belonged to the species *Bacillus* and 3 to the genus *Pseudomonas*. From each soil sample and soil+fertilizer mixture, one *Bacillus spp.* and one *Pseudomonas spp.* bacterial strains were isolated. Using API 50CH and API 20E test kits, the antimicrobial activity of 3 *Pseudomonas spp.* and 3 *Bacillus spp.* was assessed in the antimicrobial activity portion of the study. *P.fluorescens* and *P.putida* (2 units) are the

Pseudomonas species included in the study as a result of identification tests, while the *Bacillus* species are *B.lentus*, *B.subtilis*, and *B. licheniformis*.

Utilized antibiotic discs included Penicillin (P), Oxacillin (OX), Streptomycin (S), Vancomycin (VA), Ampicillin (AM), Mezlocillin (MEZ), Trimethoprim sulfamethoxazole (SXT) for *Pseudomonas spp.*, Gentamicin (GN), Aztreonam (ATM), and Ceftazidime (CAZ). According to CLSI M39-A4 specifications, the antibiotic resistance status of bacteria was determined.

Strains of *B. lentus*, *B. subtilis*, and *B. licheniformis* produced from pure soil, soil+leonardite, and soil+ammonium sulphate were unable to identify resistance changes to Penicillin, Oxacillin, and Ampicillin after a period of mixing ratio and waiting. On the 30th day, while no change in Streptomycin resistance was identified in the *B.subtilis* strain, an increase in resistance was detected in the 1/6 and 1/10 mixture of the *B.lentus* strain. On the other hand, resistance to the antibiotic Streptomycin increased on day 30 in just 1/6 of the *B. licheniformis* strain. At a combination ratio of 1/6, resistance of *B. lentus* and *B.licheniformis* strains to the Vancomycin antibiotic increased.

B. subtilis and *B. lentus* strains obtained from a soil + ammonium sulfate mixture were found to be resistant to the Vancomycin antibiotic at the conclusion of all ratios and waiting periods, while the *B. licheniformis* strain was found to be resistant on the first day, with moderate resistance on the seventh and thirty-first days in all ratios. While no change was observed in the ammonium sulfate mixture against the Streptomycin antibiotic of the *B. lentus* strain after the entire ratio and waiting time, an increase in resistance was observed at day 30 in the mixture of 1/12 of the *B. subtilis* strain and in the mixture of 1/10 and 1/12 of the *B. licheniformis* strain.

P. fluorescens, *P. putida* (1), and *P. putida* (2) strains obtained from soil + leonardite mixtures are resistant to Mezlocillin, Aztreonam, and Ceftazidime antibiotics, whereas strains obtained from soil + ammonium sulfate mixtures are resistant to Ceftazidime and Trimethoprim Sulfahydrol antibiotics. Fertilizer rate and

While no effect was observed against trimethoprim sulfamethoxazole antibiotic in the *P.flourescens* strain obtained from the soil+leonardite mixture at the conclusion of all ratios and waiting times, *P. putida* (1) strain developed resistance at a rate of 1/6, and *P. putida* (2) strain was always resistant to trimethoprim sulfamethoxazole antibiotic. At the conclusion of the 3-percent cooling interval, resistance lessened. While *P. fluorescens* strains' resistance to gentamycin antibiotic increased in soil+leonardite mixes at the mixture ratio and at the conclusion of the waiting time, *P. putida* (1) and (2) strains were found to be moderately resistant at the mixture ratio and at the end of the waiting period.

On the 30th day, *P.flourescens*, *P.putida* (2), and *P.putida* (1) strains isolated from a soil+ammonium sulphate mixture exhibited a threefold rise in resistance to the antibiotic mezlocillin, but *P.putida* (1) strain exhibited just a one-sixth increase. While *P. flourescens* strain was resistant to the Aztreonam antibiotic at a 3:1 ratio and after a waiting period, the same strain's resistance to the Gentamycin antibiotic reduced after a mixing ratio of 3:1 and after a waiting period. The same was true for *P.putida* strains, whose resistance to the antibiotic Gentamycin diminished following the soil-ammonium sulfate mixing ratio waiting period. *P.putida* (1) and (2) strains exhibited differing susceptibilities to the Aztreonam antibiotic; *P.putida* (1) was found to be susceptible after adjusting the mixing ratio and incubation period, whereas *P.putida* (2) was found to be resistant.

Keywords: Pseudomonas, Bacillus, Leonardite, Ammonium sulfate, Antibiotic resistance



ÖNSÖZ

Bu tez çalışması sürecinde,

Engin tecrübe ve bilgi birikimiyle beni yönlendiren, çalışmalarımın her aşamasında deneyimlerinden faydalanmam için imkan sunan, sadece tez çalışmamda değil her konuda ilgi ve desteğini esirgemeyen, her zaman örnek aldığım danışman hocam Sayın Prof. Dr. Özgür CEYLAN'a minnet ve şükranlarımı sunarım.

Çalışmalarımda kullandığım toprak örneklerini temin etmemde yardımcı Muğla Sıtkı Koçman Üniveristesi Tarımsal uygulama ve araştırma merkezinde görevli Dr. Öğretim Üyesi Nurediin ÖNER'e ve laboratuvar çalışmalarımda desteğini esirgemeyen sevgili arkadaşım doktora öğrencisi Büşra Eroğlu'na teşekkür ederim.

Her zaman yanımda olduklarını hissetdiren, bana güven veren annem, babam, ablam ve kardeşime en içten dileklerimle minnetdarım.

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ.....	x
İÇİNDEKİLER	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ	xiii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiv
SEMBOLLER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xvi
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI	6
2.1. Topraklarla yapılan çalışmalar.....	6
2.2. Çalışmada kullanılan gübreler	8
2.3. Antibiyotiklerin sınıflandırılması	8
2.4. Antimikrobiyal ajanlara dirençlilik (tez 3)	9
2.5. <i>Bacillus</i> türlerinin genel özellikleri ve yapılan araştırmalardan çalışmalar.....	1
2.6. <i>Pseudomonas</i> türlerinin genel özellikleri ve yapılan araştırmalardan çalışmalar.....	1
3. MATERYAL VE METOD.....	16
3.1. Materyal	16
3.1.1. Toprak örnekleri	16
3.1.2. Gübreler	17
3.1.3. Kullanılan Besiyerleri	18
3.1.4. API 20 NE İdentifikasyon kiti	19
3.1.5. API 50 CHB/E İdentifikasyon kiti.....	21
3.1.6. API 20 E İdentifikasyon Kiti	22
3.2. Metot.....	25
3.2.1. Toprak-Gübre Karışımlarının Hazırlanması.....	25
3.2.2. <i>Bacillus</i> izolasyonu	27
3.2.3. <i>Pseudomonas</i> izolasyonu	27
3.2.4. İzolatların morfolojik özellikleri.....	28
3.2.5. <i>Pseudomonas</i> 'ların Fenotipik İdentifikasyonu	28
3.2.6. <i>Bacillus</i> 'ların Fenotipik İdentifikasyonu	29
3.2.7. Antimikrobiyal Duyarlılık testlerinin yapılışı.....	30
4. BULGULAR VE İRDELEME.....	32
4.1 Toprakların kimyasal özellikleri	32
4.2. Bakterilerin Morfolojik İdentifikasyon sonuçları	33
4.3. Bakteriyel İzolatların Morfolojik özelliklerinin belirlenmesi.....	36
4.4. Gram boyama.....	36
4.5. Bakterilerin Fenotipik İdentifikasyonu	37
4.6. Antimikrobiyal duyarlılığın tespiti	41

5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	53
6. KAYNAK ARAŞTIRMASI	56
ÖZGEÇMİŞ.....	66



ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. Bakterilerin izole edildiği kaynak ve bölgeler.....	16
Çizelge 3.2. API 20NE Okuma Tablosu.....	21
Çizelge 3.3. API 20 E Okuma Tablosu.....	24
Tablo 3.4. Çalışmada kullanılan antibiyotik diskleri ve konsantrasyonları.....	31
Çizelge 4.1. Çalışmada kullanılacak olan toprak örneklerinin kimyasal özellikleri.....	32
Çizelge 4.2. İzole edilen izolatların morfolojik özellikleri.....	33
4.3. API 20 NE identifikasyon kitiyle yapılan biyokimyasal testlerin sonuçları.....	38
Çizelge 4.4. İzolatların adları, izolasyon kaynakları ve doğruluk yüzdeleri.....	38
Çizelge 4.7. API 20 E identifikasyon kitiyle yapılan biyokimyasal testlerin sonuçları.....	41
Çizelge 4.8. İzolatların adları, izolasyon kaynakları ve doğruluk yüzdeleri.....	41
Çizelge 4.9. Toprak+leonardit karışımından izole edilen <i>Bacillus sp.</i> bakterilerin antibiyotik dirençliliği.....	44
Çizelge 4.10. Toprak+ Amonyum sülfat karışımından izole edilen <i>Bacillus sp.</i> bakterilerin antibiyotik dirençliliği.....	46
Çizelge 4.11. Toprak+ leonardit karışımından izole edilen <i>Pseudomonas sp.</i> bakterilerin antibiyotik dirençliliği.....	49
Çizelge 4.12. Toprak+ Amonyum sülfat karışımından izole edilen <i>Pseudomonas</i> bakterilerin antibiyotik dirençliliği.....	51
Çizelge 4.13. Yorum kriterlerinin gösterilmesi.....	43

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 3.1. Leonardit gübresi.....	17
Şekil 3.2. Amonyum sülfat gübresi.....	17
Şekil 3.3. 275 No’lu toprağın leonardit gübresiyle 1/6 oranı karışımı.....	25
Şekil 3.4. 276 No’lu toprağın leonardit gübresiyle 1/10 oranı karışımı.....	26
Şekil 3.5. 279 No’lu toprağın leonardit gübresiyle 1/12 oranı karışımı.....	26
Şekil 4.1. Saf topraktan izole edilen <i>Bacillus</i> spp. izolatları.....	34
Şekil 4.2. Toprak+leonardit karışımlarından izole edilen <i>Bacillus</i> spp. izolatları.....	34
Şekil 4.3. Toprak+amonyum sülfat karışımlarından izole edilen <i>Bacillus</i> spp. izolatları.....	34
Şekil 4.4. Saf topraktan izole edilen <i>Pseudomonas</i> spp. izolatları.....	35
Şekil 4.5. Toprak+leonardit karışımlarından izole edilen <i>Pseudomonas</i> spp. izolatları.....	35
Şekil 4.6. Toprak+amonyum sülfat karışımlarından izole edilen <i>Pseudomonas</i> spp. izolatları.....	35
Şekil 4.7. Bakterilerin mikroskopik görüntüleri.....	36
Şekil 4.8. Oksidaz test sonucu.....	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
Şekil 4.9. <i>P.fluoresceus</i> ve <i>P.putida</i> suşlarının 24 saatlik API 20 NE kitindeki reaksiyonları.....	37
Şekil 4.10. <i>Bacillus</i> spp. bakterisinin 24 saatlik API 50 CHB İdentifikasyon Kitindeki reaksiyonları.....	39
Şekil 4.11. <i>B. lentus</i> , <i>B. licheniformis</i> ve <i>B.subtilis</i> suşlarının 24 saatlik API 20 E kitindeki reaksiyonları.....	40
Şekil 4.12. <i>B.lentus</i> , <i>B.licheniformis</i> ve <i>B.subtilis</i> suşlarının 48 saatlik API 20E kitindeki reaksiyonları.....	40
Şekil 4.13. Toprak+leonardit karışımlarından elde edilen bazı <i>Bacillus</i> suşlarının antibiyotik duyarlılık petri görünüşleri.....	42
Şekil 4.14. Toprak+amonyum sülfat karışımından elde edilen bazı <i>Bacillus</i> suşlarının antibiyotik duyarlılık petri görünüşleri.....	42

Şekil 4.15. Toprak+amonyum sülfat karışımınlarından elde edilen bazı <i>Pseudomonas</i> suşlarının antibiyotik duyarlılık petri görünümleri.....	48
Şekil 4.16. Toprak+leonardit karışımlarından elde edilen bazı <i>Pseudomonas</i> suşlarının antibiyotik duyarlılık petri görünümleri.....	48



SEMBOLLER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

Açıklama

CLSI :	Clinical and Laboratory Standart Institute
MBK :	Minimum Bakterisid Konsantrasyon
MİK :	Minimal İnhibitör Konsantrasyon
(NH ₄) ₂ SO ₄ :	Amonyum Sülfat
HCl :	Hidrolorik Asit
CaCO ₃ :	Kalsiyum karbonat
KI :	Potasyum İyodür
NaCl :	Sodyum Klorür
NaOH :	Sodyum Hidroksit
C ₂ H ₃ NaO ₂ :	Sodyum Asetat
H ⁺ :	Hidrojen iyonu
OH ⁻ :	Hidroksil iyonu
NA :	Nutrient Agar
NB :	Nutrient Broth
MAC :	MacCONKEY Agar
CA :	Cetrimide Agar
MHA :	Mueller-Hinton Agar
µg :	Mikrogram
ml :	Mililitre
gr :	Gram
g/L :	Gram/ litre
mgr :	Miligram
µm :	Mikrometre
dH ₂ O	Distile su
pH :	Toprak reaksiyonun ifadesi
mm :	Milimetre
°C :	Santigrat Derece

Simgeler**Açıklama**

N :	Azot
C:	Kabon
S :	Duyarlı
I :	Orta derecede dirençli
R :	Dirençli
P :	Penicillin
OX :	Oxacillin
S :	Streptomycin
VA :	Vancomycin
AM :	Ampisilin
MEZ :	Mezlocillin
SXT :	Trimethoprim Sulfametxozale
CN :	Gentamyin
ATM :	Aztreonam
CAZ :	Ceftaziome
NO ₃ :	Potasyum Nitrat
TRP :	Triptofan
<u>GLU</u> :	Glukozdan asit üretimi
<u>ADH</u> :	Arginin
<u>URE</u> :	Üre
ESC :	Eskülin
GEL :	Jelatin
PNPG :	p-nitrofenil-β-D-galaktopiranosit
GLU :	Glukoz kullanımı
ARA :	Arabinoz
MNE :	Mannoz
MAN :	Mannitol
NAG :	N-asetil glukozamin
MAL :	Maltoz
GNT :	Glukonat
CAP :	Kaprat
ADI :	Adipat
MLT :	Malat
CIT :	Sitrat

Simgeler**Açıklama**

PAC :	Fenil asetat
OX :	Oksidaz
ONPG :	2-nitrophenyl-βD-galaktopiranosit
ADH :	L-arginine
LDC :	L- lysine
ODC :	L-ornithine
CIT :	trisodium sitrat
H ₂ S :	Hidrojen sülfür
TDA :	L-trytophane
IND :	L-trytophane
VP :	Sodyum piruvat

GİRİŞ

Günümüzde alternatif tarım sistemlerinden biri olan organik tarımda, bitki besin maddelerinin döngüsünde ve bitki gelişiminde önemli bir faktör topraktaki mikroorganizma aktivitesidir. Bu tarım sisteminde bitki besin maddelerinin sağlandığı yegane kaynak olan organik gübreler topraktaki biyolojik aktiviteyi de önemli düzeylerde artırmaktadır. Organik yapıdaki gübrelerin topraktaki karbon (C) ve azot (N) mineralizasyonu (Hadas ve Portnoy, 1994), mikrobiyal gruplar (Acea ve Carballas, 1996) ve enzim aktivitesi (Dinesh vd., 1998) üzerine etkilerine ilişkin bazı çalışmalar yapılmıştır (Okur vd., 2007)

Tarımsal üretimde kullanılan kimyasalların (ilaç, gübre vb.) olumsuz etkilerinin insan ve toplum sağlığı üzerindeki zararları gün geçtikçe artarak kendini göstermeye başlamaktadır. Son yıllarda tüm bu olumsuz etkilerin ortadan kaldırılmasına yönelik kimyasal gübrelerin mümkün olduğu kadar az kullanılması, bunların yerine aynı görevi yapan organik gübrelerin kullanılmasına dayanan Ekolojik Tarım uygulamaları geliştirilmiştir. (Soyergin, 2003) Organik tarım, üretimde insan sağlığı için zararlı olan kimyasal gübre ve ilaçları kullanmaksızın insan ve çevre sağlığına dost, üretimden tüketime kadar her aşaması kontrollü ve serifikalı tarımsal üretim biçimi olarak tanımlanmaktadır. (Yetkin, 2010)

Organik gübreler toprak verimliliği ve sürdürülebilir tarım açısından son derece büyük bir öneme sahiptir. Ülkemizdeki toprakların tamamının organik madde içeriğinin yetersiz kalmasından dolayı tarımda organik gübre kullanımı son derece önemli bir yere sahiptir. Topraktaki organik maddenin azlığı ve besin elementleri eksikliği, gerek çiftlik gübresinin gerekse diğer organik gübrelerin topraklara verilmesinin önemini artırmaktadır.(Yetkin, 2010)

Bunun yanı tarımsal uygulamalarda ülkemizde kimyasal gübrelerin aşırı kullanımının insan sağlığı üzerinde olumsuz etkilerine yönelik pek çok araştırmalar da yapılmaktadır. Aşırı kimyasal gübrelenmenin sağlığımız üzerinde olumsuz etkileri

yapılan araştırmalarla tespit edilmiştir. Nitekim aşırı kimyasal azotlu gübreleme bitki bünyesinde insan sağlığına zararlı olan nitrat birikimini artırmaktadır. (şensoy vd., 1996). Oysa ki organik kökenli gübrelerde stabil olarak bulunan azotun yaklaşık %40-50'si ilk yıl, %12-15'i ikinci yıl, %5-6'sı üçüncü yıl ve diğer yıllarda kalan kısımlarının yavaş yavaş ayrışarak, yararlı hale gelmesinden dolayı insan sağlığı acısından riskli görülmemektedir (Herbert, 1998; Işıl vd., 2005).

Tüm karasal sistemlerin taşıyıcı nsr olan toprak su ve havaya oranla daha fazla kirleticiye maruz kaldığı için korunması son derece zor ve masraflı olmaktadır (Akman vd., 2000). Toprak kirlenmesi fiziksel ve kimyasal olmak üzere başlıca iki faktöre bağlıdır. Toprağın kimyasal kirlenmesi toprak ekosistemi ile ilgili en önemli evre problemidir (Tenover, 2006). Doğal toprağın başlıca kimyasal kirleticilerinden biri pestisitlerdir (IOC Spor, 2008). Bunun yanı sıra sodyum, potasyum, fosfor, kalsiyum, magnezyum, demir, çinko, bakır mangan, bor gibi besin maddelerini içeren suni gübrelerin aşırı ve bilinçsiz kullanımı sonucu toprağın yapısı bozulmakta ve toprak kirliliği meydana gelmektedir (Balcı ve Gedikli, 2011)

Genel olarak toprağa uygulanan gübrelerin uygulama tekniği, bitkinin fenolojik durumu ve bitki sıklığına bağlı olarak % 80-94'ünün toprağa ulaştığı bildirilmektedir (Gürkan vd., 2001). Deniz ortamında çözülmeyen klorlu pestisitler organizmaların yağlı dokularında birikmekte ve bu birikim beslenme aracılığı ile denizdeki tek hücreli canlılardan başlayarak balıklara ve balıkla beslenen kuşlara kadar ulaşarak yoğunluk kazanmaktadır. Öte yandan pestisitler kara ortamında ise bitkilerle doğrudan ya da yemler içinde hayvanların vücuduna girerek dolaylı yollardan yine insan vücuduna kadar ulaşmaktadırlar. Dolayısıyla, insanın hem hayvansal hem de bitkisel besinlerle beslenen bir canlı olması ve beslenme zincirinin son halkasını oluşturması bu tür bileşiklerin insana büyük ölçülerde yansımaya neden olmaktadır (Egemen, 1999; Balcı ve Gedikli, 2011). Pestisitlerin doğadaki akım zinciri:

Hava– bitki – toprak – insan ve

Toprak – su – hayvan – fitoplankton – balık – insan şeklindeyir (Güven, 2005; Balcı ve Gedikli, 2011).

Son zamanlarda toprakların sürdürebilir kullanımı devam ettirmek, evre kirliliğini azaltmak, azotlu ve fosforlu gübre kullanımından kaçınmak gibi sebeplerle organik toprak destekleyicileri tercih edilmektedir. Türkiye'nin tarım ülkesi olması

nedeniyle, leonardit ve türevlerinin tarımda kullanılması ülkemizin tarımının nicelik ve nitelik yönünden gelişmesine önemli katkılar sağlamaktadır. Tarım Bakanlığı'nın leonarditlerin gübre olarak kullanılabilirliği ile ilgili belirlemiş olduğu humik asit değerleri katı leonarditte toplam (humik+fulvik) asit en az %40, sıvı (humik+fulvik) asit en az %12'dir. (Vedat vd., 2012; Balcı ve Gedikli, 2011)

Organik madde toprak ekolojik dengesinin devamlılığında etkili bir faktördür. Toprağın; fiziksel, kimyasal ve biyolojik özelliklerine iyileştirici etkisi, biyolojik olayların kaynağı ve bitkilere devamlı besin deposu olması nedeniyle toprağın doğal verimliliğini olumlu etkilemektedir. (Çolak, 1980; Cenkseven, 2006)

Toprak yalnız bitkilerin değil, aynı zamanda mikroorganizmaların da yaşadığı ve ürettiği bir ortamdır. Mikroorganizmaların sayıları, tür ve faaliyetleri topraktaki ölü organik maddelerin bileşim ve miktarına, ortam koşullarına, toprak reaksiyonuna, sıcaklık ve neme bağlı olarak değişim göstermektedir. (Ünal ve Rasheed, 1972; Cenkseven, 2006).

Toprakta gözlenen biyokimyasal reaksiyonlar mikroorganizmalar tarafından gerçekleştirilmektedir. Büyük çoğunluğu heterotrof olan toprak mikroorganizmaları, salgıladıkları enzimlerle organik maddenin içinde bulunan protein, nişasta, selüloz, lignin ve fosfat esterleri gibi kompleks bileşikler mikroorganizmalar ve bitkilerin alabileceği formlara dönüştürmektedir. (Hofmann, 1986; Jonasson vd., 1996). Bu mikrobiyal faaliyet karbon ve besin varlığından güçlü bir şekilde etkilenmektedir. Örneğin; topraklara karbon eklenmesi toprakta karbon mineralizasyon oranını, mikrobiyal biomas ve enzim aktivitesini arttırabilmektedir (Joergensen ve Scheu, 1999; Cenkseven 2006).

Toprak mikroflorasının önemli bir kısmı *Bacillus spp.* cinsi bakterileridir. Bacillaceae familyası içerisinde yer alan *Bacillus* türleri, aerop, fakültatif anaerop, gram pozitif (+), endosporlu bakterilerdir (Demirbağ vd.,2005; Logan ve Turnbull, 2002; Berkeley, 1997; Topçal vd., 2014). *Bacillus* genusuna ait türlerin çoğu güvenli mikroorganizmalardır. Tarım ve endüstriyel amaçlarda başarılı şekilde kullanılmakta olan pek çok maddeyi sentezleyebilme kabiliyetine sahiptirler. Çoğu mikroorganizmada olduğu gibi, *Bacillus* türleri de gıdalarda patojen veya bozulma etkeni mikroorganizmaların büyümesini önleyebilen veya onları öldüren farklı çeşitlerde bileşik (bakteriosinler) üretmektedirler (Bennik vd., 1997; Hill, 1995;

Topçal vd., 2014). *Bacillus* türleri genel olarak, patojenik bakteri ve funguslara karşı terapötik ajanlar olarak potansiyel uygulamaya sahip peptitler, lipopeptitler, fosfolipitler ve polienler üretmektedirler. (Stover ve Driks, 1999; Galvez vd., 2007; Topçal vd., 2014). Antimikrobiyal bileşiklerin gıdalarda biyokorucu olarak kullanımı günümüzde gittikçe popüler hale gelmektedir. Son yıllarda, bilinçli sahip tüketiciler, sağlıklı hayat tarzlarına uygun doğal gıdalara yönelmektedirler. Bu kimyasal koruyucular katkısız gıdaları içermektedir. (Galvez vd., 2007; Zotta vd., 2009; Topçal vd., 2014). Antimikrobiyal maddeler, gıda koruyucuları kapsamında önem kazanmakla beraber, bitki patojenlerinin biyolojik kontrolü için de önemlidir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda farklı *Bacillus* tür ve suşları tarafından üretilen sekonder metabolitlerin, çeşitli bitki patojenlerine karşı antimikrobiyal aktivite gösterdiği vurgulanmaktadır. (Ongena ve Jacques, 2008; Katz ve Demain, 1977; Yu vd., 2002; Topçal vd., 2014).

Bacillus cinsi bakteriler, antibiyotik, enzim ve toksin üretimi gibi metabolik özellikleri ile endüstriyel öneme sahip olmaları ve kolay üretebilmeleri sebebiyle dikkat çeken mikroorganizmalardır. (Rosovitz vd., 1998; Wipat ve Harwood, 1999; Odabaş, 2011) Ayrıca, sporlanma kabiliyetleri ve metabolizma faaliyetlerinin çeşitliliği geniş bir çevreye yayılmalarında önemli avantajlar sağlamaktadır (Wipat ve Harwood, 1999; Odabaş, 2011).

Pseudomonas spp. aerobik, gram negatif olup, tarımsal topraklarda yaygın olarak bulunan ve toprak kök yüzeyine adapte olmuş mikroorganizmalardır. (Cook ve Baker, 1983; Güler, 2010). Biyolojik mücadele etmeni olarak geniş bir kullanıma sahip olan *Pseudomonas spp.* bakterileri; antibiosis, mikroparazitizm, yer ve besin rekabeti gibi etki mekanizmalarına sahiptirler. *Pseudomonas spp.* bakterilerinin fungal patojenlerin toprakta bulunan popülasyonunu sınırlandırdığı ve bu patojenlerin neden oldukları hastalıkları azalttıkları yapılan araştırmalarda tespit edilmiştir. (Haas ve Defago, 2005; Fravel, 1988; Güler, 2010).

Tarımsal faaliyetlerde kimyasal ilaç kullanımı yerine; çevreyi kirletmeyen ve çevreyle dost olan antagonistik mikroorganizmaların doğrudan veya dolaylı olarak kullanımı önem arz etmektedir. Biyolojik mücadelede kullanılacak başarılı antagonist mikroorganizmaların endüstriyel olarak; fazla pahalı olmayan kepek, talaş, buğday samanı, linyit granülleri, mısır unu, kum kültürü, peat gibi substratların üzerinde hızla

fermantasyonu gerçekleştirmekle ve kolayca üretilebilmektedir (Fravel, 2005; Güler, 2010).

20. yüzyılın başlarında çağın en büyük keşiflerinden biri olan antibiyotiklerin bulunması ve üretimi, tıp tarihindeki en büyük başarılarından birini teşkil etmektedir (Van Hoek vd., 2011; Usta Ak, 2017). Ancak antibiyotiklerin yaygın olarak kullanımları, hatalı ve akılcı olmayan kullanımlarını da beraberinde getirmektedir. Gelişmiş ülkelerde en fazla satılan ilaçlar içinde antibiyotikler ikinci sırada iken, ülkemizde ve gelişmekte olan ülkelerde birinci sırada yer almaktadır. Antibiyotiklerin günümüzde aşırı kullanımları beraberinde çeşitli mikroorganizmalarda direnç sorununu gündeme getirmektedir. Bu durum gözönüne alındığında her hangi bir enfeksiyona karşı akılcı antibiyotik seçimi kaçınılmaz hale gelmektedir (Tabak, 1997; Usta Ak, 2017).

Antibiyotik kullanımının sıklığı ve kullanımdaki artış ile direnç gelişiminin engellenmesi bir tarafa, mikroorganizmalar bu duruma direncin birçok çeşidini geliştirerek cevap vermektedirler. Bununla beraber antimikrobiyal ilaç kullanımı arttıkça, bakteriyel patojenlerin sahip oldukları direnç mekanizmalarının seviyesi ve karmaşıklığı da artmaktadır (Tenover, 2006; Usta Ak, 2017).

Bu çalışmada Muğla ilinin farklı bölgelerine ait toprak örneklerinden; in vitro koşullarda, izole edilen *Pseudomonas spp.* ve *Bacillus spp.* bakterilerinin tür tespitinin yapılması, organik olarak leonardit ve kimyasal olarak amonyum sülfat gübreleri kullanılarak elde edilen toprak-gübre karışımlarından izole edilen bakterilerde kullanılan antibiyotiklere karşı farklı 3 oranda (1/6, 1/10, 1/12) ve farklı 3 zaman (1, 7, 30 gün) bekletilmek suretiyle direnç değişiminin tespit edilmesi amaçlanmıştır.

KAYNAK ARAŞTIRMASI

Bugüne kadar yapılan literatür taramalarında *Pseudomonas sp.* ve *Bacillus sp.* türleriyle ilgili çalışmalar ve araştırmalar kısaca özetlenmiştir.

1.1.Topraklarla yapılan çalışmalar

Jakoveroka vd. (2001), organik maddelerin mikrocanlı faaliyetine etkisini incelemelerinde, toprağa farklı ayrışma derecelerine sahip organik maddeler karıştırarak toprak mikroorganizmalarının biyolojik ayrışmayla basit ve potansiyel aktivitesini standart nem ve sıcaklıkta adsorbsiyan metodu ile ölçmüşlerdir. Sonuçta test edilen tüm organik madde eklentilerinin CO₂ üretimine faydalı etkileri olduğunu belirlemişlerdir (Cenkseven, 2006)

Aşkın vd. (2004) , Ondokuz Mayıs Üniversitesi Kampus topraklarının bazı mikrobiyolojik özelliklerini belirlemek amacıyla yaptıkları çalışmada, 5 farklı toprak serisinden 0-20 cm derinlikten toprak örnekleri almışlar ve enzim aktiviteleri ile CO₂ üretimi ve mikrobiyal aktivitelerini incelemişlerdir (Cenkseven, 2006).

Howell ve Stipanovic (1980), *Pseudomonas fluorescens*'in bir izolatının pamukta *Pythium ultimum*'un neden olduğu çökerten hastalığını engellediğini yapılan genetik çalışmalarda da *P. fluorescens* tarafından salgılanan Oomycin A adında bir antibiyotik bu etkileşimde önemli rol oynadığını tespit etmişlerdir (Güler, 2010)

Linberg ve Granhall (1984); Jayaswal vd., (1993); Pandey vd., (2001) tarafından yapılan sera çalışmalarında, *Pseudomonas putida*'nın mısır ve buğdayda sırasıyla *Fusarium oxysporum* solgunluğu ve *Gaeumannomyces graminis*'in gelişimini engellediklerini ve böylece bitkilerin hastalanmadığını belirlemişlerdir. Ayrıca aynı araştırmacılar, siderofor üreten *Pseudomonas flourescens* izolatlarının domates ve kavunda *Fusarium oxysporum*'un neden olduğu solgunlukları engelleyici

etkisini iki yıllık tarla denemesinde araştırmışlardır. Çalışma sonunda seçilen 7 izolatın kavun ve karpuz tohumlarına uygulanmasıyla hastalık şiddetinin kontrollere göre sırasıyla, %84 ve %43 oranında azaldığını bildirmişlerdir (Güler, 2010).

Fravel (1988); Banger ve Thomashow (1996); Louws vd., (2001) tarafından yapılan çalışmalarda *Pseudomonas fluorescens* CHAO izolatının ürettiği metabolitlerin hıyar ve mısırdaki *P.ultimum*'un neden olduğu çökerten hastalığını piyoluteorin ve 2,4-diasetifloroglukinol engellediğini vurgulamışlardır (Güler, 2010).

P. fluorescens ve *P. Putida*'nın bazı izolatlarının bitki gelişmesini teşvik ettirerek, ürünlerde verimliliği arttırdığı yapılan çalışmalarda incelenmiştir (Picard vd., 2000; Thomashow, 1996; Güler, 2010). Kloepper vd. (1980) tarafından *Pseudomonos spp.* bakterilerinin bitki gelişimini teşvik eden rizobakteriler (PGPR) olarak adlandırmışlardır. Yararlı etkileriyle bilinen bu toprak bakterileri fitopatogenik funguslara karşı antagonist olarak birçok çalışmada da kullanılmıştır (Kloepper vd., 1989; Weller, 1988; Güler, 2010).

Rizobakterler toprak kökenli bitki patojenlerine karşı biyolojik etmen olarak kabul edilip bitki sağlığı açısından önemli role sahiptirler. Toprak verimliliğini de arttırmalarından dolayı kök yüzeyinde etkili bir etmen olarak kullanılmaktadırlar (Weller, 1988; Raaijmakers vd., 1997; Picard vd., 2000; Begsma-Vlami vd., 2005; Güler, 2010).

Pseudomonos spp.'lerin kökte hızlı bir şekilde kolonize olanlarının biyolojik kontrolde başarılı olduğu rapor edilmiştir (Keel vd., 1992; Lugtenberg vd., 2001; Raaijmaker ve Weller, 2001; Güler, 2010).

Tarımsal kimyasalların yerine alternatif olarak kullanılan *Pseudomonas* bakterilerinin kök bölgesinde kolonize olarak kök yüzeyinde siderofor ya da antibiyotik üretme özellikleriyle biyokontrol etki gösterdiği bazı çalışmalarda tespit edilmiştir (Leong, 1986, Tomashow vd., 1990; Sneh, 1984; Güler, 2010).

Voisard vd., (1989); Muleta, (2007) *Pseudomonas spp.* bakterilerinin fungal patojenlerin bulunduğu bölgede hidrojen siyanid üretilmesiyle bitki patojenlerinin gelişimini bastırarak, hastalıkları kontrol altına aldıklarını incelemişlerdir (Güler, 2010)

1.2.Çalışmada kullanılan gübreler

Bu çalışmada farklı tekstüre sahip topraklara organik gübre olarak leonardit ve kimyasal gübre olarak amonyum sülfat farklı oranlarda (1/6, 1/10 ve 1/12) karıştırılarak toprakta olan mikroorganizmalar (*Bacillus sp.* ve *Pseudomonas spp.*) üzerindeki etkisi araştırılmıştır.

Doğada bulunan organik materyaller farklı konsantrasyonlarda humik madde içeriğine sahiptirler. En önemli humik madde kaynaklarının başında milyonlarca yıl içerisinde humifikasyon sonucunda oluşan karbon ve humik asit içeriği fazla olan kömürleşmiş linyitin okside olunmuş formu olan leonardit gelmektedir. Leonardit ve gıda gibi organik materyallerin bulunduğu ortamlarda bitki köklerinin besin elementlerini kolayca adsorbe etmesi ve mikrobeyin elementlerinin yararlılığının artmasının en önemli nedenlerinden birisi de içerdiği humik ve fulvik asitlerden kaynaklanmaktadır (Padem ve Öcal, 1999, Pettit, 2012; Dindaroğlu vd., 2015)

Leonardit, bitki besin elementleri bakımından toprakla kıyaslandığında, fosfor (P_2O_5) yönünden yüksek, potasyum (K) bakımından fakirdir, kalsiyum karbonat ($CaCO_3$) içerikleri çok yüksek, toprak reaksiyonları (pH) nötr civarındadır. (Olivella vd., 2002; Engin vd., 2012)

Leonarditin, metamorfizma ve hümfikasyon şiddetine bağlı olarak hümfik asit içeriği %35-80, nem oranı %25-40 aralığında değişmektedir. Siyah- kahverengi görümlü, elle kolaylıkla ufalanabilecek sertliktedir. Yoğunluğu 0,75–0,85 gr/cm³, pH değeri ise 3-5 arasında değişmektedir. %1 lik KOH ve NaOH solüsyonlarında çözünürlüğü yüksek, suda çözünürlüğü ise düşüktür. Çözeltisi siyah parlak renkte, köpüksü, koloidal ve yağsı görünümündedir. pH değeri 8-9 olan toprakla hazırlanan satürasyon çamurunda kolay çözülür. (Olivella vd., 2002; Engin vd., 2012).

1.3.Antibiyotiklerin sınıflandırılması

Antibiyotikler, mikroorganizmalar üzerindeki etki derecelerine, etki mekanizmalarına, kimyasal yapılarına ve farmakokinetik özelliklerine göre çeşitli şekillerde sınıflandırılabilirler. Vücut sıvılarında oluşturdukları konsantrasyonlarda, mikroorganizmalar üzerindeki etki derecelerine göre bakteriyostatikler ve

bakterisidler olmak üzere iki şekilde sınıflandırılmaktadırlar. (Aktuğlu 1997; Ulusoy, 1999; Anonymous, 2000; Karahan, 2016)

Bakteriyostatikler bakteri hücresinin gelişimini veya üremesini engellerler. Büyümesi ve üremesi durmuş bakteriler vücudun savunma mekanizmaları tarafından kolayca yok edilmektedir. Bakteriyostatik etki gücünün göstergesi ise “Minimum İnhibitör Konsantrasyon = MİK” dir. Tetraskilinler, Makrolidler, Sülfanomidler, Amfenikoller, Linkozamidler, Metronidazol ve Mikazonal bakteriyostatik etkiye sahiptirler.

Bakterisidler ise bakterileri dolaysız yolla yok etmektedirler. Bakterisid etki mekanizmasının göstergesi ise “Minimum Bakterisid Konsantrasyon = MBK”dır. Beta laktamlar, Florokinolonlar, Vankomisin, Rifamisin ve Teikoplanin bakterisid etkiye sahiptirler (Demirtürk, 2013; Karahan, 2016)

1.4.Antimikrobiyal ajanlara dirençlilik

Bakteriler antimikrobiyal maddelere karşı çeşitli direnç mekanizmaları geliştirmişlerdir. Antibiyotikler bakteri tarafından enzimatik inaktivasyona uğratarak veya parçalanarak, toksik etkisi yok edilmektedir. Buna en iyi örnek β -laktam halkasına sahip antibiyotiklere karşı gösterilen dirençliliktir. Örneğin penisilin, penisilinaz enzimi ile hidroliz edilmektedir. (Hancock ve Speert, 2000; Gülcan, 2006).

Antibiyotiğin etki ettiği hedef bölgesinin değiştirilmesi ile de direnç sağlanabilmektedir. Hedef bölgede bulunan aminoasidin değiştirilmesiyle, antibiyotiğin hedef bölgeye olan ilgisi azalmaktadır. Örneğin penisilin, penisilin bağlayan proteinlere (PBG) geri dönüşümsüz olarak bağlanmakta ve böylece peptidoglikan sentezi inhibe edilmektedir. Penisilinin bağlandığı bu hedef bölge (PBG)’de meydana getirilen değişiklik sonucu antibiyotik bağlanamamakta ve direnç sağlanmaktadır. (Silvia, 1996; Gülcan, 2006)

Antibiyotiğin hücre içine girişi engellenerek toksik etkisine karşı direnç sağlanmaktadır. Hücre membranı, antibiyotiğin hücre içine girişini engelleyen bir bariyer görevi yapmaktadır. Gram pozitif bakterilerin sahip oldukları kalın peptidoglikan tabakasının gram negatiflerde bulunan dış membrana göre koruyuculuğu daha fazladır. Ancak gram pozitif bakterilerin çeşitli toksik maddelere

karşı daha duyarlı olduğu belirtilmiştir. Dış membranda bulunan porinlerin (kanal proteinleri) sayısında ve lipopolisakkarit miktarında meydana getirilen değişiklikler, bir bariyer görevi yapan membranın geçirgenliğini etkilemekte ve antibiyotiğe karşı dirençlilik sağlanabilmektedir (Hancock ve Speert, 2000; Gülcan, 2006).

Hücre içine giren antibiyotik, aktif olarak hücre dışına atılarak sitoplazmadaki konsantrasyonu azaltılmakta ve direnç sağlanmaktadır. (Hancock ve Speert, 2000; Gülcan, 2006).

Pseudomonas türlerinin çoğu antimikrobiyal ajanlara dirençlidirler. Antibiyotik ve ilaç duyarlılığı çalışmaları, yeni türlerin ortaya çıkmasını sağlayacak kadar önemli ve faydalı çalışmalardır. (Hancock ve Speert, 2000; Gülcan, 2006)

Birçok antibiyotik ajana dirençli olmasına rağmen *Pseudomonas* enfeksiyonlarına karşı kullanılan antibiyotikler de mevcuttur. En önemli gruplar; aminoglikozidler (gentamisin ve tobramisin gibi), yarı sentetik penisilinler (karbenisilin, tikarsilin ve piperasilin gibi), üçüncü kuşak sefalosporinler (sefdazidim ve sofoperazon gibi), quinolonlar (siporofloksasin) ve kabepenemlerdir (meropenem ve imipenem) (Hancock ve Spreet, 2000; Gülcan, 2006)

Bacillus cinsi bakterileri izolasyonunun kolaylığı, geniş metabolik aktiviteye sahip olması, üretiminin basit ve kısa sürede gelişimi gibi nedenlerden dolayı araştırmada tercih edilmektedir. (Rosovitz vd.,1998; Wipat ve Harwood, 1999). Yapılan pek çok çalışmalarda *Bacillus* cinsinin antimikrobiyal madde üretim potansiyelinin yüksek olduğu ifade edilmektedir (Eltem ve Uçar, 1998; Cash, 1998; Gülcan, 2006)

Bacillus'ların antimikrobiyal madde üretme nedenleri bilinmemekle beraber, habitatlarındaki rekabete karşı antibiyotikleri salgıladıkları düşünülmektedir (Todar, 2014). *Bacillus* türlerinin oluşturduğu antimikrobiyallerin yapıları farklı olduğu gibi etki mekanizmaları da birbirinden farklı olabilmektedir. Öyle ki, hücre duvarı sentezini bozan ya da hücre membranına zarar veren etkileri olan antimikrobiyaller üretmenin yanı sıra protein sentezini engelleyen (Patel vd., 1995) antimikrobiyaller sentezleye bilmektedirler.(Gülcan, 2006)

Bacillus suşları tarafından üretilen antimikrobiyal maddelerin çoğu Gram pozitif bakterilere ve funguslara karşı etkilidir. Ayrıca Gram negatif bakterilere karşı duyarlı birkaç peptid antimikrobiyal madde de üretilmektedirler (Perez vd., 1992;

Gülcan, 2006). Yapılan çalışmalarda *Bacillus* suşlarının antibakteriyel aktivitesinin Gram pozitif ve Gram negatif bakteriler arasında yer alan *Yersinia enterocolitica*, *Micrococcus flavus*, *Staphylococcus aureus* (Chatterjee vd., 1992; Aslım vd., 2002) *E. coli* (Perez vd., 1992; Aslım vd., 2002), *Pseudomonas aeruginosa* (Perez vd., 1992) ve *Micrococcus luteus* (Perez vd., 1993) gibi patojen bakterilerle aynı etkinliğe sahip olduğu rapor edilmiştir.(Gülcan, 2006)

1.5. *Bacillus* türlerinin genel özellikleri ve yapılan araştırmalardan çalışmalar

Bacillus adı, 1872 yılında Ferdinand Cohn tarafından kullanılmıştır. (Lin, 1997) Bacillaceae ailesine ait olan *Bacillus* cinsi, çubuk şekilli, endospor oluşturan, aerob veya fakültatif anaerob bakterilerden oluşmaktadır . Vegetatif hücreler, tek başına veya zincir şeklinde bulunabilmektedir. Yuvarlak veya köşeli şekilde biten hücrelerin büyüklükleri 0,5x1,2µm'den 2,5x10µm'ye değişmektedir. Hücrede bulunan sporun şekli ve yeri, türler arasında farklılık göstermektedir. Hücreler Gram-pozitif reaksiyon göstermesine rağmen bazıları kültürün yaşına bağlı olarak Gram-negatif reaksiyon göstermektedirler (Rosovitz vd., 1998; Sneath, 1986; Odabaş, 2011)

Optimum büyüme sıcaklıkları 25°C ile 37°C arasında değişmektedir. Ancak termofilik ve psikofilik türleri 75°C'den daha yüksek ve 3°C'den daha düşük sıcaklık derecelerinde büyüebilme yeteneğine sahiptirler. Bazı türleri pH'sı 2 ile 10 arasında değişen alkali ve asidik ortamlarda gelişebilmektedirler. (Sneath, 1986; Odabaş, 2011)

Bacillus türlerinin özellikleri çevresel şartlara bağlı olarak değişmektedir. Besiyeri çeşidi, koloninin yaşı gibi özelliklere göre, yarı şeffaf, opak, düzgün ya da pürüzlü koloniler görülebilmektedir. Koloni renkleri, kreme yakın beyazdan sarıya doğru değişebilmektedir. Çoğu *Bacillus* türü pigment oluşturmaz ancak bazı türler farklı besi yerlerinde sarı, yeşil, mavi-siyah vb. pigmentler üretebilmektedirler (Rosovitz vd., 1998; Sneath, 1986; Odabaş, 2011)

Bacillus genusuna ait türlerin çoğu güvenli mikroorganizmalardır. Tarım ve endüstriyel amaçlarda başarılı şekilde kullanılmakta olan pek çok maddeyi sentezleyebilme kabiliyetine sahiptirler. Çoğu mikroorganizmada olduğu gibi, *Bacillus* türleri de gıdalarda patojen veya bozulma etkeni mikroorganizmaların

büyümesini önleyebilen veya onları öldüren farklı çeşitlerde bileşikler (bakteriosinler) üretmektedirler. (Bennik vd.,1997; Hill, 1995; Topçal vd., 2014)

Bacillus türleri genel olarak, patojenik bakteri ve funguslara karşı terapötik ajanlar olarak potansiyel uygulamaya sahip peptitler, lipopeptitler, fosfolipitler ve polienler üretirler ve üretilen antimikrobiyal bileşenlerin çoğu peptit orijinlidir (Stover ve Driks, 1999; Galvez vd.,2007; Topçal vd., 2014).

Bacillus spp.'ler bakteriyosin ve antibiyotik gibi antimikrobiyal bileşikler de üretmektedirler. Bu bileşikler genellikle tıp, gıda ve biyolojik çalışmalarda kullanılmaktadırlar. Günümüzde birçok mikroorganizma antibiyotiklere karşı direnç kazanmıştır. Bu nedenle yeni izole edilen mikroorganizmaların antibiyotik üretmesi ve geniş antimikrobiyal aktiviteye sahip olması önemli olmaktadır. (Perez vd.,1993; Katı vd., 2016)

1.6. *Pseudomonas* türlerinin genel özellikleri ve yapılan araştırmalardan çalışmalar

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 bulunmaktadır (Carson vd., 1973; Gülcan , 2006).

Pseudomonas'ların geniş bir yayılım göstermeleri çok basit gelişim ihtiyaçlarına gereksinim duymalarından kaynaklanmaktadır. Minimal besin varlığında 4-43⁰C gibi geniş bir sıcaklık aralığında gelişebilmektedirler. Cinsin bir çok türünün gelişimine gösterdiği optimum sıcaklık 30⁰C'dir. Türlerin tamamı nötral veya alakali pH (7.0-8.5) aralığında daha iyi gelişmektedir (Cowan vd., 1974; Gülcan, 2006).

Pseudomonas'lar 0,5-1,0x1,5-5,0 µm boyutunda düz veya hafif eğimli basillerdir. *Pseudomonas* suşlarının, mikroskopik görünümleri nadiren büyük ve şekil olarak normalden çok farklı olabilmektedir. 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 etmektedirler. Hareket için gerekli olan enerjiyi aerobik metabolizmadan sağlarlar. Nadiren hareketsiz olan *Pseudomonas* suşları da mevcuttur (Cowan, 1974; Gülcan, 2006).

Pseudomonas türlerin Pseudomonadaceae familyası içerisinde yer alırlar. Bazı türleri insan, hayvan ve bitki patojeni olan *Pseudomonas* cinsi bakterilerin çoğu doğada toprak ve sularda yoğun olarak bulunmaktadır (Ulusoy, 2007; Karakaş, 2013).

Pseudomonas cinsinin üyeleri 2 gruba ayrılmıştır (Holt vd., 1994). Birinci grup; bazı ortamlarda pigment üretenler, ikinci grup ise polibetahidroksibütirat asit depolayıp, pigment üretmeyenler olarak tanımlanmışlardır (Holt vd., 1994; Güler, 2010).

Bu bakterilerin ürettikleri antiyobiyotik benzeri bakteriyosin ve fenozinin ile patojenik mikroorganizmaların gelişimlerini inhibe ettiklerini (Vessey, 2003; Hariprasad ve Nijanjana, 2008); antiyobiyotiğin, sideroforun, (Hafeez vd., 2006 ve Whipps 2001); ve hidrojen siyanitin, Ahmad vd., (2008) bitki gelişimini teşvik ettiğini tespit etmişlerdir. (Güler, 2010)

P. fluorescens, *P. chlororaphis* ve *P. putida* gibi bazı araştırmacılar tarafından bazı türlerinde pilus gözlenirken bazı türlerinde pilusa rastlanılmamaktadır (Holt vd., 1994). *Pseudomonas*'lar genellikle 0.5-1.0 veya 1.5-5.0 µm çapında olup çeşitli karbon kaynaklarında ve düşük azot ortamında gelişebilmektedirler (Holt vd., 1994; Güler, 2010).

Pseudomonas bakterilerinin fosfor, demir ve azota olan istekleri farklılık göstermektedir. En iyi gelişme gösterdikleri sıcaklık 28 °C olarak belirlenmiştir. Oksidaz testlerinde değişik reaksiyon vermekle birlikte katalaz testleri pozitif olarak belirlenmiştir. *Fluoresan Pseudomonas*'lar piyoverdin pigmenti üretmeleriyle pigmentli yapıya sahip oldukları gibi fluoresan olmayan türlerde de pigmentsiz yapı göstermektedirler (Holt vd., 1994). *Pseudomonas* türlerinin çoğu glukoz, fruktoz, galaktoz ve L-arabinozu gelişimleri için kullanılmaktadırlar (Guo vd., 2007; Güler, 2010).

Pseudomonas bakterilerinin besin istekleri, serolojik analizler, plasmid, faj, protein, yağ asiti gibi profilleri, nükleik asit problemleri, antibiyotiklere dirençlilikleri gibi testler tanımlamalarında kullanılmaktadır (Guo vd., 2007; Güler, 2010).

Pseudomonas bakterilerinin içerdikleri lipoprotein yapıları da tanımlanmalarında kullanılmıştır (Holt vd., 1994). Lipopolisakkaritinin iç kısmı hidrokarbon zinciriyle akışkanlık veren özel bir lipid (LPS)'den oluşmaktadır. Lipopolisakkarit, hücreye spesifik bir antijenik kimlik kazandırmaktadır. Bakterilerin dış membranı antibiyotikler gibi zararlı şeylere karşı bir bariyer özelliğine sahip olduğu açıklanmıştır (Holt vd., 1994; Thomashow vd., 1996; Güler, 2010).

Bitki gelişiminde etkili olan, biyokimyasal özelliklere sahip olup olmadıkları göz önünde bulundurularak patojenleri baskılamadaki rolleri de incelenmiştir. *Pseudomonas* spp. ve *fluoresan Pseudomonas* izolatları toprak kökenli bitki patojenlerine karşı besin kaynakları için rekabet, antibiyotik sentezleme (2-4-diasetilfloroglukinol-DAPG, fenozin-1-karboksilik asid-PCA-pirolnitritin) ve patojen mikroorganizmaların hücre duvarını parçalayan enzim (sellüloz, proteaz, glukanaaz, kitinaz) üretebilme özelliğine sahiptirler. Sistemik direnci uyaran (ISR) çeşitli özelliklere sahip mekanizmalarıyla toprak kökenli bitki patojenlerini baskı altına almaktadırlar (Walsh vd., 2001, Homma vd., 1989, Klein Gunneiveck vd., 1998; Güler, 2010).

Pseudomonas cinsinin toprak, petrole kirlenmiş toprak, deniz, tatlı su ve hayvanların sindirim sistemlerinde bulunduğu araştırmacılar tarafından vurgulanmıştır (Chythanya vd., 2002; Tanaka vd., 2003; Karakaş, 2013).

Pseudomonas cinsi gıdalarda, toprakta, insan ellerinde kontaminant olarak bulunmakta ve bu bakterileri değişik organik ve inorganik maddeleri yaşamı için kullanmaktadırlar. Bu bakteriler toprağın yanısıra sularda gelişen bir mikroorganizma olup değişik türlerde tuzlu ortamlarda ve tatlı sularda da bulunduğu bazı araştırmacılar tarafından araştırılmıştır. (Demnerovavd, 2005; Karakaş, 2013).

Ekşi vd., (2007) *Pseudomonas* kökenlerinde doğru tedavi politikalarını oluşturulabilmesini ve antibiyotik direncin artmasını engellemek amacıyla uygulanan antibiyotik kullanımlarında etkili olduklarını belirtmişlerdir.(Karakaş, 2013)

Jenifer vd (2013), toprak kökenli bitki hastalıklarının bastırılmasında, *Pseudomonas* tarafından yönetilen siderofor aracılı ve antibiyotik aracılı iki mekanizmayla gerçekleştiğini belirtmişlerdir. Böylece, mevcut çalışmalarda biyokontrol ajanı olarak siderofor üreten bakterinin iyi bir gösterge olarak hizmet

verdiği belirtilmiştir. Bu alanda daha fazla çalışma yapılarak tarım alanında karşılaşılan problemler için bir çözüm olabileceğini açıklamışlardır. (Karakaş, 2013)



MATERYAL VE METOD

1.7. Materyal

3.1.1. Toprak örnekleri

Bu çalışma, Muğla ilinin üç farklı bölgesinden (Merkez – Esençay, Ula-Karaböğürtlen, Milas - Kızılcayıkık) alınmış toprak örneklerine 2 farklı gübre (Leonardit ve amonyum sülfat) karıştırılarak izole edilen *Bacillus* ve *Pseudomonas* izolatlarıyla gerçekleştirilmiştir. Bakterilerin izole edildiği kaynak ve bölgeler Çizelge 3.1` de belirtilmiştir.

Çizelge 3.1 Bakterilerin izole edildiği kaynak ve bölgeler

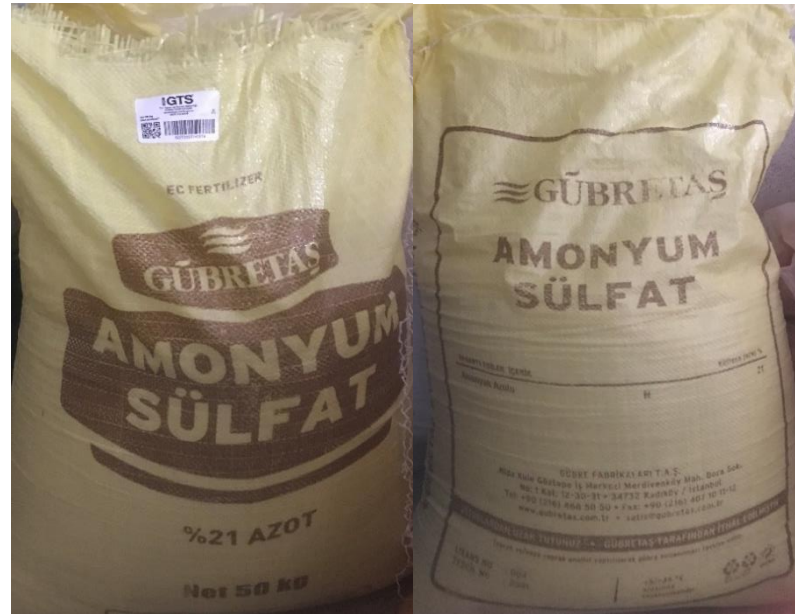
Bakterilerin izole edildiği toprak kodları	Karıştırılan Gübreler	İzole edildiği Bölge
275	Leonardit Amonyum sülfat	Merkez – Esençay
276	Leonardit Amonyum sülfat	Ula – Karaböğürtlen
279	Leonardit Amonyum sülfat	Milas - Kızılcayıkık

3.1.2. Gübreler

Bu çalışmada kullanılan organik gübre olarak leonardit, kimyasal gübre olarak amonyum sülfat kullanılmıştır. Bu gübreler ticari olarak elde edilmiştir. Kullanılan gübrelerin fotoğrafları aşağıdaki şekil 3.1. ve 3.2.'de gösterilmiştir.



Şekil 3.1. Leonardit gübresi



Şekil 3.2. Amonyum sülfat gübresi

Leonardit gübresinin içeriği %40 Organik madde, %40 himuk+fulvik asit, %25 maksimum nemden oluşmaktadı. pH değeri 2-5'dir.

Amonyum sülfat gübresinin içeriği ise %21 amonyak azotundan oluşmaktadı.

3.1.3. Kullanılan Besiyerleri

Nutrient Agar

<u>Birleşimi</u>	<u>gr/lt</u>
Peptone	5.0 gr
Et Extract	3.0. gr
Agar	12.0 gr

Karışımđan 20 gr alınıp 1000 ml distille suda eritilerek 15 dakika 121⁰C-de otoklavlanmak sureti ile sterilize edilmiştir.

Nutrient Broth

<u>Birleşimi</u>	<u>gr/lt</u>
Peptone	5.0 gr
Meat extract	3.0 gr

Karışımđan 8 gr tartılarak 1000 ml distille suda zlmştır. Sonrasında 15 dakika 121⁰C'de otoklavda sterilize edilmiştir.

Mac Conkey Agar

<u>Birleşimi</u>	<u>gr/lt</u>
Peptone from casein	17.0 g/L
Peptone from meat	3.0 g/L
NaCl	5.0 g/L
Lactose	10.0 g/L
Bile salt mixture	1.5 g/L
Neutral red	0.03 g/L
Crystal violet	0.001 g/L

Agar 13.5 g/L

Karışımından 50 gr alınıp 1000 ml distille suda eritilip, 15 dakika 121⁰C de otoklavlanmak sureti ile sterilize edildi.

Pseudomonas Agar

<u>Birleşimi</u>	<u>gr/Lt</u>
Gelatin pepton	16.0 gr
Casein hydrolysate	10.0 gr
Potassium sulphate	10.0 gr
Magnesium chloride	1.4 gri
Agar	11.0 gr

24.2 gr toz karışımı 500 ml distile suda eritilerek üzerine 5 ml gliserol eklenmiştir. 121⁰C-de 15 dakika oktoklavlandıktan sonra karışımın ısısı yaklaşık olarak 50⁰C'ye kadar düşünce 1 flakon supplement (SR 103 E) ilave edilmiştir.

Pseudomonas C-F-C Selektive Supplement

<u>Birleşimi</u>	<u>mgr/Lt</u>
Cetrimide	5 mgr
Fucidin	5 mgr
Cephaloridine	25 mgr

3.1.4. API 20 NE İdentifikasyon kiti

API 20 NE 8 geleneksel ve 12 asimilasyon testini ve bir veri tabanını birleştiren enterik olmayan Gram negatif (*Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Flavobacterium*, *Moraxella*, *Vibrio*, *Aeromonas* vb.) bakterilerin tanımlanması için standartlaştırılmış bir sistemdir.

API 20NE stripleri kurutulmuş besiyeri ve substrat içeren 20 mikrotüpten oluşmaktadır. Saf bakteri kolonileri steril serum fizyolojik içeren tüplerde süspansiyonları hazırlanarak bu mikrotüplere inoküle edilmiştir. İnkübasyon

esnasında metabolizma sonucu kendiliğinden veya ayrıçlara bağı olarak renk değışimlerine sebep olmaktadır. Asimilasyon testleri için AUX Medium besiyeriyle karıştırılarak inoküle edilen bakteriler eğer substratı kullanabilirlerse gelişmektedirler.

API 20 NE Test Kitini oluşturan öğeler:

- 25 API 20NE stripti
- 25 İnkübasyon kutusu
- 25 ampul API 20NE (AUX Medium) besiyeri
- 25 adet sonuç tablosu
- Mineral yağ
- McFarland standart sıvısı
- API NaCl 0.85% medium , 2 ml

AUX Medium içeriği:

- | | |
|---------------------|---------|
| - Amonyum sulfat | 2 g |
| - Agar | 1.5 g |
| - Vitamin solüsyonu | 10.5 ml |
| - Diğer elementler | 10 ml |
| - Monosodyum fosfat | 6.24 g |
| - Potasyum klorür | 1.5 g |
| - Distille su | 1000 ml |

pH : 7.0 – 7.2

API 20NE striplerindeki reaksiyonlar ve sonuçları izelge 3.2’de verilmiştir.

Çizelge 3.2. API 20NE Okuma Tablosu

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

3.1.5. API 50 CHB/E İdentifikasyon kiti

API 50 CHB/E besiyeri *Bacillus* ve ilgili cinslerin yanı sıra Enterobacteriaceae ve Vibrionaceae familyalarına ait Gram negatif basillerin tanımlanmasına yönelik bir sistemdir. API 50CH strip üzerinde 49 karbonhidratın fermentasyonunun çalışılmasına imkan veren kullanıma hazır besiyeridir.

Test edilecek mikroorganizma ile ortamda bir süspansiyon yapılmış ve ardından stripin her bir tüpü süspansiyon ile aşılanmıştır. API 20 E stripi, ek testler sağlamak için API 50 CH stripi ile birlikte kullanılmıştır. Sonuçlar tanımlama çizelgesi arayıcılığı ile elde edilmiştir.

API 50 CHB/E Test Kitini oluşturan Öğeler:

- API 50 CH stripti
- API 20 E stripti
- API 20 E reagent kiti
- 10 ampul API 50 CHB/E Medium besiyeri
- API NaCl 0.85 % medium, 5 ml
- Mineral yağ
- McFarland standart sıvısı

API 50 CHB/E Medium içeriği

- Ammonium sulfat	2 g
- Yeast extract	0.5 g
- Tripton (sığır/domuz kökenli)	1 g
- Disodyum fosfat	3.22 g
- Monopotasyum fosfat	0.12 g
- Diğer elementler	10 ml
- Fenol kırmızısı	0.17 g
- Distile su	1000 ml

pH 7.4 – 7.8; 20-25⁰ C

3.1.6. API 20 E İdentifikasyon Kiti

API 20 E *Enterobacteriaceae* ve diğer zor üremeyen gram negatif çubuklar için 21 minyatür biyokimyasal test ve bir veri tabanı kullanan standartlaştırılmış bir tanımlama sistemidir.

API 20 E stripti, suyu alınmış substratlar içeren 20 mikrotüpten oluşur. Bunlar besiyerini sulandıran bir bakteri süspansiyonu ile aşılınmış testlerdir. İnkübasyon sırasında metbalizma kendiliğinden veya reaktivlerin eklenmesiyle ortaya çıkan renk değişikliklerine sebep olmaktadır.

API 20 E Test Kitini Oluşturan Öğeler:

- 25 API 20 E stript
- 25 inkübasyon kutusu
- 25 sonuç tablosu
- 1 klip mühür
- 1 propektüs
- API NaCl 0.85 % Medium, 5 ml
- API süspansiyon Medium, 5 ml
- API 20 E reagent kiti
- Zn reagenti
- Oksidaz
- Mineral yağ



API 20 E striplerindeki reaksiyonlar ve sonuçları Çizelge 3.3’de verilmiştir.

Çizelge 3.3. API 20 E Okuma Tablosu

Test	Substrat	QTY (mg/cu p.)	Reaksiyon/ Enzimler	Sonuç	
				Negativ	Pozitiv
ONPG	2-nitrophenyl-βD-galactopyranoside	0.223	B-galactosidase (Ortho NitroPhenyl -βD-galactopyranoside)	renksiz	sarı
ADH	L- arginine	1.9	Arginine DiHydrolase	sarı	kırmızı turuncu
LDC	L- lysine	1.9	Lysine DeCarboxylase	sarı	kırmızı turuncu
ODC	L-ornithine	1.9	Ornithine DeCarboxylase	sarı	kırmızı turuncu
CIT	trisodium citrate	0.756	CITrate utilization	açık yeşil/sarı	Mavi- yeşil/mavi
H₂S	sodium thiosulfate	0.075	H ₂ S production	renksiz/ grimsi	Siyah tortu/ ince çizgi
URE	Urea	0.76	UREase	sarı	kırmızı turuncu
TDA	L – tryptophane	0.38	Tryptophane DeAminase	TDA/ hızlı reaksiyon sarı	Kırmızımsı kahverengi
IND	L – tryptophane	0.19	INDole production	JAMES/ hızlı reaksiyon renksiz açık yeşil/ sarı	pembe
VP	sodium pyruvate	1.9	Acetion production (Voges Proskauer)	VP1 + VP2/ 10 dakika renksiz	pembe/ kırmızı
GEL	Gelatin (bovine origin)	0.6	GELatinase	Difüzyon yok	Siyah pigment difüzyonu
GLU	D-glucose	1.9	Fermentation/oxidation (GLUcose)	mavi/ mavi-yeşil	Sarı/grimsi sarı

3.2 Metot

3.2.1. Toprak-Gübre Karışımlarının Hazırlanması

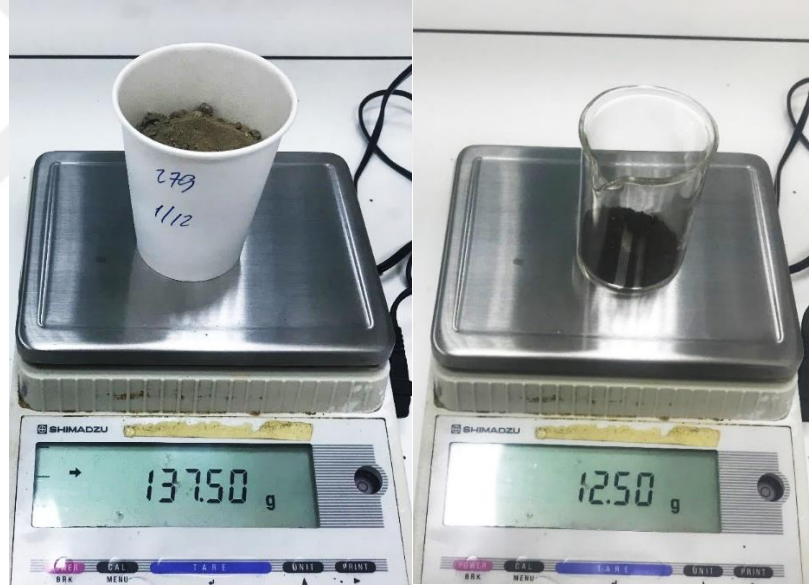
Toprak-Gübre karışımları hazırlamak için leonardit ve amonyum sülfat gübreleri kullanılmıştır. Her iki gübre için 1/6, 1/10 ve 1/12 oranında gübre-toprak karışımı hazırlanmış ve bu toprak karışımlarına numaralar verilmiştir. Toprak-gübre karışımlarından bakteri izolasyonunu sağlamak için 1., 7. ve 30. gün olacak şekilde karışımlar nemlendirilerek uygun şartlar sağlanmıştır. Her bir toprak için yapılan bütün bu işlemlerden bazı toprak-gübre karışımları aşağıdaki şekil 4.1., 4.2., 4.3’de ve çizelge 4.2’de belirtilmiştir.



Şekil 3.3. 275 No’lu toprağın leonardit gübresiyle 1/6 oranı karışımı



Şekil 3.4. 276 No'lu toprağın leonardit gübresiyle 1/10 oranı karışımı



Şekil 3.5. 279 No'lu toprağın leonardit gübresiyle 1/12 oranı karışımı

3.2.2. *Bacillus* izolasyonu

Her bir toprak örneğinden 5'er gr tartılmış ve 25 ml fizyolojik suda çözülmüştür. Bu karışımlar iki dakika beklemeye bırakılmış ve sonrasında karışımların üzerindeki sıvıdan 1,5 ml alınıp mikrosantrifüj tüplere koyularak 80°C'de 5 dakika su banyosunda bekletilmiştir. Sonra bu tüplerin üzerinden 1 ml alınıp sodyum asetatlı (C₂H₃NaO₂) Nutrient Broth'a (NB) ilave edilmiştir. Bu tüpler 37°C'de 4 saat inkübe edildikten sonra 80°C'de 5 dakika su banyosunda bekletilmiştir. Daha sonra %7 sodyum klorür(NaCl) içeren Nutrient Agar (NA) besiyerlerine ekim yapılmış ve 37°C'de 3-4 gün inkübasyona bırakılmıştır (Bülbüloğlu, 2000).

Saf kültürlerin hazırlanması

İnkübasyon sonunda oluşan farklı morfoloji ve renge sahip koloniler seçilmiş, elde edilen saf kültürler, Nutrient Broth (NB) ve Nutrient Agar besiyeri ortamına (NA) alınmıştır. Bu izolatlar identifikasyon ve antibiyotik duyarlılık çalışmalarına kadar +4°C'de muhafaza edilmiştir.

3.2.3. *Pseudomonas* izolasyonu

Kullanılan toprak örneklerinden steril şartlar altında 1 gr alınmış 9 ml steril fizyolojik suya ilave edilerek iyice karıştırılmıştır. Karışımların 10⁻¹ – 10⁻⁶ seri dilüsyonları hazırlanmıştır. Her bir dilüsyondan 0,1 ml alınarak MacCONKEY Agar (MCA) besiyerine inoküle edilmiştir. Örnekler steril drigalski spatülü ile besiyeri ortamı yüzeyine homojen şekilde yayılmıştır. Petriler 37±0,1°C'de 24-48 saat inkübe edilmiştir. Üreme gösteren bakterilerden şeffaf renkli küçük koloniler seçilerek *Pseudomonas* Agar besiyerine aktarılmıştır. Petriler, 24-48 saat 37±0,1°C'de inkübe edilmesi için bırakıldı. (Malik ve Kaisüal 2000; Jensen vd., 2001)

Saf kültürlerin hazırlanması

İnkübasyon sonunda oluşan farklı morfoloji ve renge sahip koloniler seçilmiş, elde edilen saf kültürler, Nutrient Broth (NB) ve Nutrient Agar besiyeri ortamına (NA) alınmıştır. Bu izolatlar identifikasyon ve antibiyotik duyarlılık çalışmalarına kadar +4°C'de muhafaza edilmiştir

3.2.4. İzolatların morfolojik özellikleri

Elde edilen izolatların morfolojik özellikleri (koloni rengi, koloni büyüklüğü, koloni tipi) belirlenmiştir. Bakterilerin morfolojik özelliklerinin belirlenmesi için gram boyama işlemi uygulanmıştır. Elde edilen izolatların Gram boyama testleri yapılmıştır. (Cappuccino ve Sherman, 1992) Bacillus izolasyonu için Gram pozitif, Pseudomonas izolasyonu için Gram negatif kolonilerden seçim yapılmıştır.

3.2.5. Pseudomonas'ların Fenotipik İdentifikasyonu

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

Bu amaçla nutrient broth besiyerinden saf kültürler nutrient agar besiyerine ekilerek aktif hale getirilmişlerdir. Bu petrilerden öze kullanılarak 1-4 koloni daha önceden kullanıma hazırlanmış 2 ml'lik %0,85'lik steril serum fizyolojik tüplerine inoküle edilmiş ve steril mikropipetler kullanılarak 0,5 McFarland bulanıklılığında homojen bir süspansiyon hazırlanmıştır. Bu süspansiyondan aynı pipetle NO₃ testinden PNPG testine kadar hava kabarcığı kalmayacak şekilde sadece tüp kısımlarına inokülasyon yapılmıştır. Daha sonra bu süspansiyondan 200 µl AUX Medium'a eklenerek hava kabarcığı oluşturmeyecek şekilde karışım sağlanmıştır ve bu karışım kalan GLU edilmiştir. Kuyu kısımlarının konveks ya da konkav olmaması, düz bir şekil alması sağlanmıştır. Daha sonra GLU, ADH ve URE testleri için anaerobik ortam sağlamak amacıyla mikrotüplerin kuyu kısımları konveks menisküs şeklinde mineral yağ ile doldurulmuştur.

Bir tabla ve bir kapaktan oluşan inkübasyon kaplarında nemli bir ortam sağlamak amacıyla 5 ml distile su petekli yapıdaki tablaya dağıtılmıştır. Mikrotüplerden oluşan stripler bu tablalara yerleştirilerek kapakları kapatılmıştır. Suş numaraları inkübasyon kutularına yazılarak susların karışması önlenmiş ve 30±0,1°C'de 24 ve 48 saat inkübe edilmiştir.

İnkübasyon sonunda GLU, ADH, URE, ESC, GEL ve PNPG test sonuçları kaydedilmiştir. NO₃ testi için ise önce NIT 1 hemen ardından NIT 2 ayraçları damlatılarak 5 dk beklenmiş, eğer sonuç negatif ise 2-3 mg Zn tozu eklenerek 5dk

sonra tekrar sonuç alınmıştır. TRP testi için kuyucuğa bir damla James ayırıcı damlatılarak reaksiyon sonucu hemen kaydedilmiştir. Asimilasyon testlerinde ise küyü kısmında opak renk görülmesi bakteriyel gelişmenin pozitif olduğunun göstergesidir. 24 saatlik inkübasyon sonunda yapılan bu işlemlerin ardından ayıraç eklenen test tüpleri mineral yağ ile kapatılarak 24 saat daha inkübe edilmiş ve 48 saat sonunda sonuçlar tekrar kaydedilmiştir.

3.2.6. Bacillus'ların Fenotipik İdentifikasyonu

İzolatların tür düzeyinde tiplendirilmeleri, gram pozitif basiller için spesifik olan biyokimyasal test kiti API 20E şeridi ve API 50CHB (Bacillus) şeritlerindeki testler ile yapılmıştır. (API Laboratuvar Ürünleri, Basingstoke, Hants., UK) API 20E şeridinde 12 test ve API 50CHB şeritlerinde 49 test kullanılmıştır.

Bu amaçla nutrient broth besiyerinden saf kültürler nutrient agar besiyerine ekilerek aktif hale getirilmişlerdir. Bu petrilerden öze kullanılarak 1-4 koloni daha önceden kullanıma hazırlanmış 5 ml'lik %0,85'lik steril serum fizyolojik tüplerine inoküle edilmiş ve steril mikropipetler kullanılarak 0,5 McFarland bulanıklılığında homojen bir süspansiyon hazırlanmıştır. Bu süspansiyondan 10 ml API 50 CHB/E Medium'a eklenerek hava kabarcığı oluşturmayacak şekilde karışım hazırlanarak tüpler inokülasyon yapılmıştır.

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

İnkübasyon sonucunda kırmızı renklerin sarıya dönüşmesiyle ortaya çıkan sarı renk onun pozitif olmasını tespit etmiştir. Bütün bu sonuçlar sonuç tablosunda kaydedilmiştir.

API 20E test kiti için de nutrient broth besiyerinden saf kültürler nutrient agar besiyerine ekilerek aktif hale getirilmişlerdir. Bu petrilerden öze kullanılarak 1-4 koloni daha önceden kullanıma hazırlanmış 5 ml'lik %0,85'lik steril serum fizyolojik tüplerine inoküle edilmiş ve steril mikropipetler kullanılarak 0,5 McFarland

bulanıklılığında homojen bir süspansiyon hazırlanmıştır. Bu süspansiyon 10 ml API Suspension Medium'a eklenerek hava kabarcığı oluşturmayacak şekilde karışım hazırlanmıştır. Bu süspansiyondan GLU testine kadar olan kısmı inokülasyon yapılmış, çünkü son 8 test API 50CHB/E ile aynı olduğu için yeniden inokülasyonu yapılmamıştır.

İnokülasyon sonucunda ONPG, ADH, LDC, ODC, CIT, H₂S, URE, GEL ve GLU test sonuçları kaydedilmiştir. TDA testi için TDA reaktivi eklenmiş, sonucu hemen kaydedilmiştir. IND testi için kuyucuğa bir damla James ayırıcı damlatılarak reaksiyon sonucu hemen kaydedilmiştir. VP testi için VP1 ve VP2 reagentleri eklenerek 10 dakika beklenmiş ve sonuçlar sonuc tablosunda kaydedilmiştir. 24 saatlik inkübasyon sonunda yapılan bu işlemlerin ardından ayıraç eklenen test tüpleri mineral yağ ile kapatılarak 24 saat daha inkübe edilmiş ve 48 saat sonunda sonuçlar tekrar kaydedilmiştir.

3.2.7. Antimikrobiyal Duyarlılık testlerinin yapılışı

İzolatların antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesi amacıyla disk difüzyon metodu kullanılmıştır (Collins 1995, Castro-Escarpulli vd., 2003). İzolatların antibiyotiklere karşı olan duyarlılıklarının tespiti için kullanılan antibiyotik diskleri ve konsantrasyonları Tablo 3.4'de verilmiştir. NB'de aktifleştirilen ve yoğunluğu 0,5 Mcfarland bulanıklık tüpüne göre ayarlanan bakteri kültürlerinden 100 µl alınmış ve MHA içeren petrilere inoküle edilmiştir. Kültür, drigalski özesi ile besi ortamının yüzeyine homojen bir şekilde yayılmıştır. Antibiyotik diskleri, steril bir pens yardımı ile besi ortamı yüzeyine yerleştirilmiş ve 37 °C'de 24 saat inkübe edildikten sonra diskler etrafında meydana gelen inhibisyon zonları mm cinsinden ölçülmüştür (Castro-Escarpulli vd., 2003). Elde edilen zon çapları CLSI M39-A4 standartlarına göre değerlendirilmiştir.

Tablo 3.4. Çalışmada kullanılan antibiyotik diskleri ve konsantrasyonları

Antimikrobik Madde	Sembol	Konsantrasyon
Penicillin	P	10 µg
Ampicillin	AM	10 µg
Oxacillin	OX	1 µg
Streptomycin	S	10 µg
Vancomycin	VA	30 µg
Mezlocillin	MEZ	75 µg
Trimethoprim sulfamethoxazole	SXT	1.25/ 23.75 µg
Gentamicin	GN	10 µg
Aztreonam	ATM	30 µg
Ceftazidime	CAZ	30 µg

4. BULGULAR VE İRDELEME

4.1 Toprakların kimyasal özellikleri

Çalışmada Muğla ilinin Merkez-Esençay, Ula-Karaböğürtlen, Milas-Kızılcaıyık bölgelerinden alınan 3 farklı toprak numunesi kullanılmıştır. Toprak örnekleri aseptik şartlara uyularak yüzeyden 0-20 cm arası derinlikten alınarak laboratuvara getirilmiş ve her birine farklı numaralar verilmiştir. Alınan toprak örnekleri +4⁰C’de ve karanlık ortamda muhafaza edilmiştir. Toprak örneklerinin pH, Kireç ve organik madde, fosfor (P), potasyum (K), kalsiyum (Ca), Magnezyum (Mg), Sodyum (Na), Demir (Fe), Bakır (Cu), Mangan (Mn) ve Çinko (Zn) özellikleri laboratuvar ortamında tespit edilmiş ve aşağıdaki çizelge 4.1’de verilmiştir.

Çizelge 4.1. Çalışmada kullanılacak olan toprak örneklerinin kimyasal özellikleri

İLÇESİ	MEVKİ	pH	Kireç	Org. Madde	P	K	Ca	Mg	Na	Fe	Cu	Mn	Zn
MERKEZ	ESENÇAY	8,0	26,9	0,2	25	373	7.158	84	15	30	1	53	1
ULA	KARABÖRTLEN	7,8	8,8	1,4	9	38	4.778	22	9	21	2	33	0
MİLAS	KIZILCAYIKIK	6,1	0,3	1,0	25	31	958	84	22	46	1	28	1

Esençay bölgesinden elde edilen toprak örneğinin pH değeri 8.0, Karaböğürtlen bölgesinden elde edilen toprağın pH’ı 7.8 olarak tespit edilmiş olup orta alkali olarak değerlendirilmiştir. Kızılcaıyık bölgesi toprak örneğinin pH’ı 6.1 olması olarak belirlenmiş olup hafif asitli olarak değerlendirilmiştir.

Toprak kireçliliği toprakta bulunan kalsiyum karbonat (CaCO₃) oranına göre değerlendirilmektedir. Bu sonuçlar Çağlar (1949) ve Evliya (1964)’nın verilerine göre değerlendirilmektedir. Çalışmada kullanılan toprak örnekleri içerdikleri kireç oranına göre farklılık göstermiştir. Çalışmada kullanılan toprak örneklerinden Esençay bölgesinin toprağı çok fazla kireçli, Karaböğürtlen toprağı orta kireçli, Kızılcaıyık bölgesinin toprağı ise çok az kireçli olarak tespit edilmiştir. Çalışmada kullanılan

toprak örnekleri içerisinde en yüksek organik madde Karaböğürtlü toprak örneğinde, en az organik madde ise Kızılcaıykık örneğinde belirlenmiştir.

Toprak örnekleri içerisinde en fazla potasyumun (P) Esençay bölgesi örneğinde, kalsiyumun ise Kızılcaıykık bölgesi örneğinde olduğu görülmüştür. Organik madde yönünden en zengin örneğin Karaböğürtlüden elde edilen toprak olduğu tespit edilmiştir.

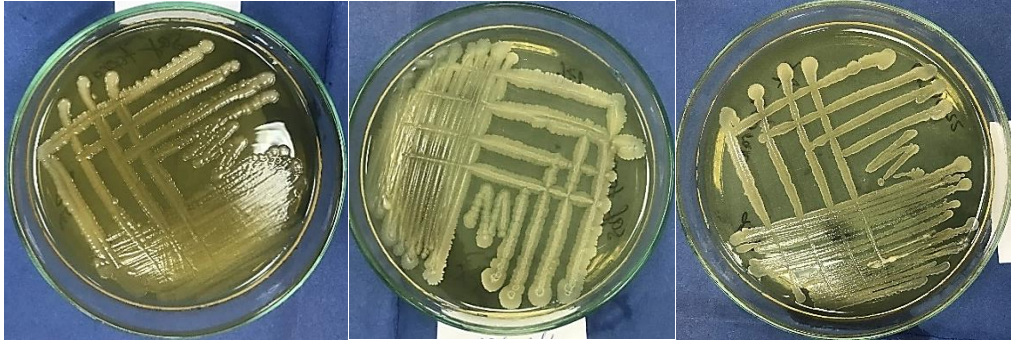
4.2. Bakterilerin Morfolojik İdentifikasyon sonuçları

İzolasyon petlerinde üreyen kolonilerin morfolojik özellikleri (rengi, büyüklüğü, tipi) belirlenmiştir. Ve bütün bu özellikler aşağıdaki Çizelge 4.2’de belirtilmiştir.

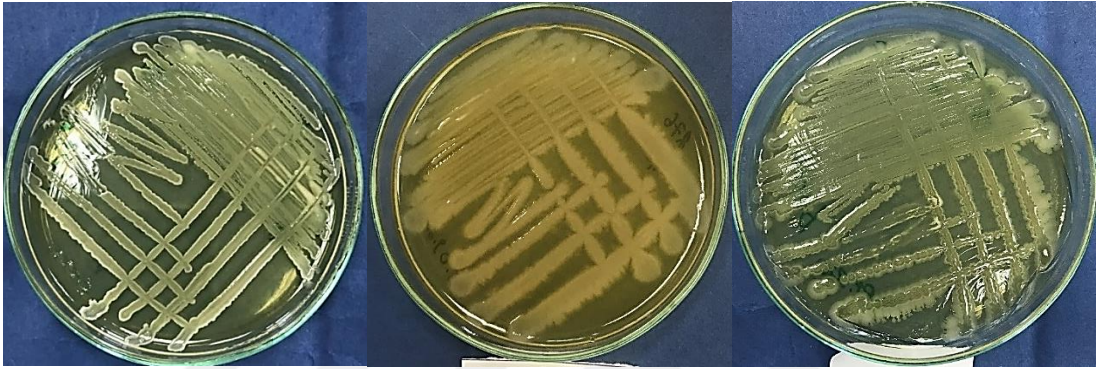
Çizelge 4.2. İzole edilen izolatların morfolojik özellikleri

İzolat No’su	Koloni rengi	Koloni büyüklüğü (cm)	Koloni tipi
275 Bacillus	krem	0.3	R
276- Bacillus	beyaz	0.3	R
279-Bacillus	krem	0.4-0.6	S
275 -Pseudomonas	sarı	0.1-0.2	S
276 Pseudomonas	krem	0.1	S
279 Pseudomonas	krem	0.1	S

Bu çalışmada Muğla ilinin 3 farklı bölgelerinden elde edilen bakteri izolatlarından toplam 8 adet *Bacillus sp.* suşu ve 3 adet *Pseudomonas sp.* izole edilmiştir. İzolatların koloni morfolojileri tespit edilmiş, koloni tiplendirmeleri ile Gram boyama testleri yapılmıştır. Ön idetifikasyon testleri tamamlanan izolatlar antibiyotik duyarlılık işlemleri yapıncaya kadar Nutrient Agar (NA) ve Nutrient Broth (NB) besiyerlerinde +4°C’de muhafaza edilmiştir (Malik ve Kaisüal 2000, Jensen vd 2001, Bülbüloğlu, 2000). İzolatlardan bazılarına ait petri görüntüleri Şekil 4.1., 4.2., 4.3., 4.4., 4.5. ve 4,6’da verilmiştir.



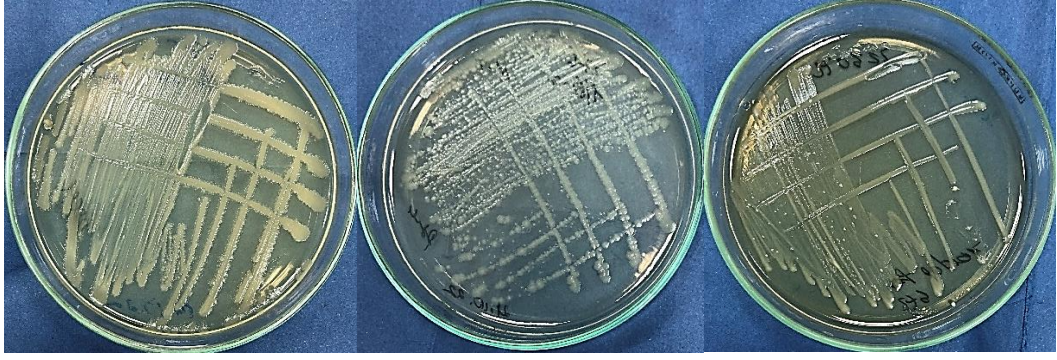
Şekil 4.1. Saf topraktan izole edilen *Bacillus* spp. izolatları



Şekil 4.2. Toprak+leonardit karışımlarından izole edilen *Bacillus* spp. izolatları



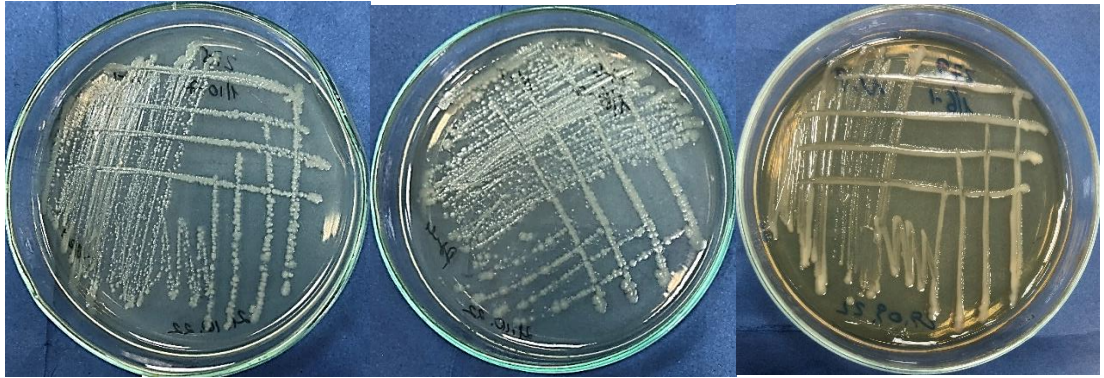
Şekil 4.3. Toprak+amonyum sülfat karışımlarından izole edilen *Bacillus* spp. izolatları



Şekil 4.4. Saf topraktan izole edilen *Pseudomonas* spp. izolatları



Şekil 4.5 Toprak+leonardit karışımlarından izole edilen *Pseudomonas* spp. izolatları



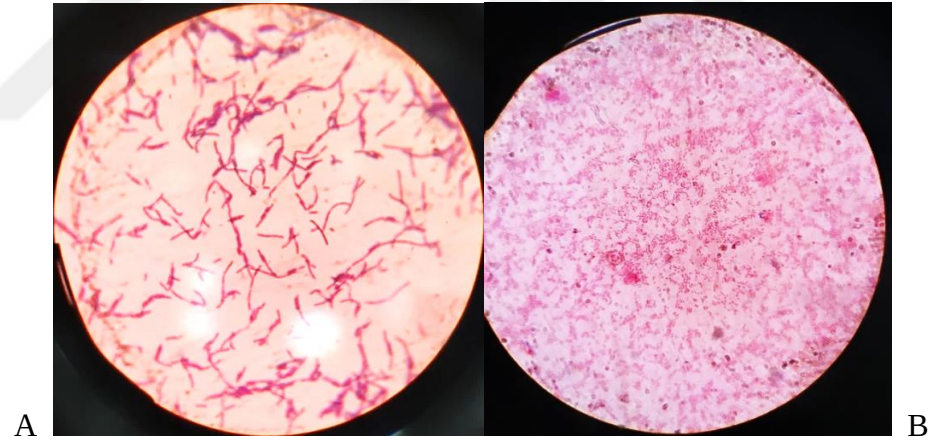
Şekil 4.6. Toprak+amonyum sülfat karışımlarından izole edilen *Pseudomonas* spp. izolatları

4.3. Bakteriyel İzolatların Morfolojik özelliklerinin belirlenmesi

Bakteriler ilk olarak NB besiyerine inoküle edilmiş, 24 saat 30°C’de inkübasyona bırakılmıştır. NB besiyerinde aktifleştirilen bakteriler NA besiyerine tek koloni ekim yapılarak 30°C’de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Üreme gösteren bakterilerin, koloni büyüklüğü, tipi ve pigment üretimleri kaydedilmiştir. Ayrıca bu kolonilerden lam üzerine yayma preparat hazırlanarak mikroskopik görüntüleri kontrol edilmiştir

4.4. Gram boyama

Çalışmaya dahil edilen *Bacillus spp.* ve *Pseudomonas spp.* izolatlarının Gram Boyama mikroskop görüntüleri Şekil 4.7’de verilmiştir.



Şekil 4.7. Bakterilerin mikroskopik görüntüleri

A) Gram pozitif basil bakterisinin mikroskopik görüntüsü

B) Gram negatif basil bakterisinin mikroskopik görüntüsü

4.5. Bakterilerin Fenotipik İdentifikasyonu

Çalışmada elde edilen izolatların fenotipik karakterizasyonu API test kitleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. *Pseudomonas* izolatlarının tür tespiti API 20 NE, *Bacillus* izolatlarının tür tespiti ise API 50 CHB ve API 20 E test kitleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Çalışmada kullanılan *P. fluorescens* ve *P. putida* suşlarının API 20 NE test sonuçları Çizelge 4.4’de ve Şekil 4.12’da verilmiştir.



Şekil 4.9. *Pseudomonas fluorescens* ve *Pseudomonas putida* suşlarının 24 saatlik API 20 NE kitindeki reaksiyonları

API 20 NE test kiti sonuçlarına göre 275 No’ lu izolat *Pseudomonas fluorescens*, 276 ve 279 No’lu izolatlar *Pseudomonas putida* olarak tanımlanmıştır. API 20 NE tanımlama kitinin biyokimyasal test sonuçları çizelge 4.3.’de: izolasyon kaynakları ve doğruluk yüzdeleri çizelge 4.4’de verilmiştir.

4.3. API 20 NE identifikasyon kitiyle yapılan biyokimyasal testlerin sonuçları

Testler	İzolat No 'su		
	275	276	279
NO ₃	-	+	+
TRP	-	-	-
GLU	-	-	-
ADH	-	+	+
URE	+	-	-
ESC	+	+	+
GEL	-	-	-
PNPG	-	-	-
GLU	+	+	+
ARA	+	+	+
MNE	+	-	-
MAN	+	-	-
NAG	+	-	-
MAL	+	-	-
GNT	+	+	+
CAP	+	+	+
ADI	-	-	-
MLT	+	+	+
CIT	+	+	+
PAC	-	+	+
OX	+	+	+

Çizelge 4.4. İzolatların adları, izolasyon kaynakları ve doğruluk yüzdeleri

Suş №	Bakteri adı	İzolasyon kaynağı	Doğruluk yüzdesi (%)
275	Pseudomonas fluorescens	Esençay / Merkez	83
276	Pseudomonas putida (1)	Karaböğürtlen/ Ula	98,3
279	Pseudomonas putida (2)	Kızılcaıyık/Milas	98,3

API 50 CHB identifikasyon kiti kullanılarak elde edilen identifikasyon sonuçları Şekil 4.10'de verilmiştir.



Şekil 4.10. Bacillus spp. bakterisinin 24 saatlik API 50 CHB İdentifikasyon Kitindeki reaksiyonları

İzolatlara ait API 20 E test kiti görüntüleri ve elde edilen test sonuçları Şekil 4.11 ile 4.12’de: biyokimyasal test sonuçları Çizelge 4.7.’de verilmiştir..



Şekil 4.11. *B. lentus*, *B. licheniformis* ve *B. subtilis* suşlarının 24 saatlik API 20 E kitindeki reaksiyonları



Şekil 4.12. *B. lentus*, *B. licheniformis* ve *Bacillus subtilis* suşlarının 48 saatlik API 20 E kitindeki reaksiyonları

Çizelge 4.7. API 20 E identifikasyon kitiyle yapılan biyokimyasal testlerin sonuçları

Suş No	ONPG	ADH	LDC	ODC	CIT	H ₂ S	URE	TDA	IND	VP	GEL	GLU
275	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-
276	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-
279	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-

API 50 CHB ve API 20 E test kiti sonuçlarına göre 275 No' lu izolat *B. lentus*, 276 No'lu izolat *B. subtilis* ve 279 No'lu izolat *B. licheniformis* olarak identifiye edilmiştir. API 50 CHB VE API 20E identifikasyon kiti sonuçları, izolasyon kaynakları ve doğruluk yüzdeleri Çizelge 4.8'de verilmiştir.

Çizelge 4.8. İzolatların adları, izolasyon kaynakları ve doğruluk yüzdeleri

Suş No	Bakteri adı	İzolasyon kaynağı	Doğruluk yüzdesi (%)
275	Bacillus lentus	Esençay / Merkez	82
276	Bacillus subtilis	Karabörtlen/ Ula	96,5
279	Bacillus licheniformis	Kızılcayıkık/Milas	99,9

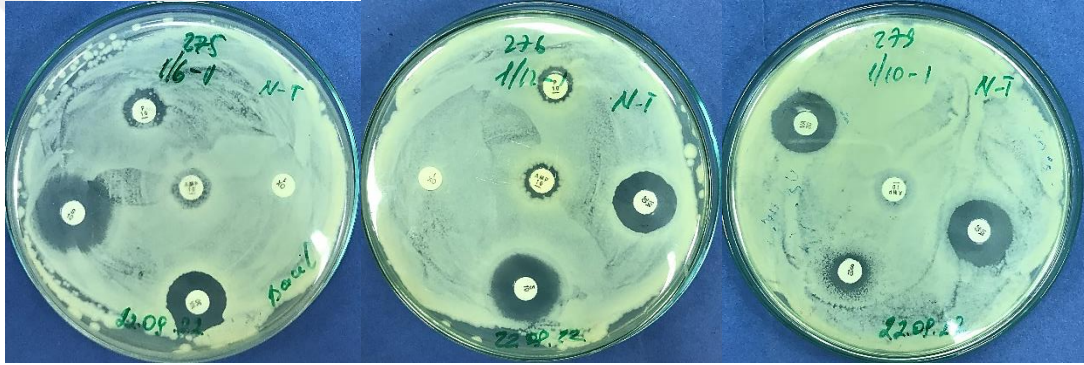
4.6. Antimikrobiyal duyarlılığın tespiti

Çalışmada kullanılan *Bacillus spp.* ve *Pseudomonas spp.* türlerinin antibiyotik duyarlılık testleri disk difüzyon metodu kullanılarak tespit edilmiştir. Toprak örnekleri ve belirli konsantrasyon ve sürelerde toprak gübre karışımlarının *Bacillus spp.* ve *Pseudomonas spp.* bakterileri üzerindeki antibiyotik duyarlılık etkilerini belirlemek için uygun antibiyotik diskler belirlenmiştir. (Bergogne-Berezin ve Towner, 1996; Singh vd., 2006)

Bacillus sp. bakterilerinin antibiyotik dirençlilik durumlarının belirlenmesi için Penicilin, Oxacillin, Streptomycin, Vancomycin ve Ampicillin diskleri kullanılmıştır. Bu antibiyotik diskler saf topraktan izole edilen ve 1., 7., 30. gün toprak+leonardit, toprak+ amonyum sülfat karışımlarından elde edilen bakterilere uygulanmıştır. Bu çalışmalara ait petri görüntüleri aşağıdaki şekil 4.13 ile 4.14'de ve çizelge 4.9 ile 4.10'da verilmiştir.



Şekil 4.13. Toprak+leonardit karışımlarından elde edilen bazı Bacillus suşlarının antibiyotik duyarlılık petri görünüşleri



Şekil 4.14. Toprak+amonyum sülfat karışımından elde edilen bazı Bacillus suşlarının antibiyotik duyarlılık petri görünüşleri

Bir izolatın yorum kriterine göre duyarlı, orta dirençli ve dirençli olduğu zon çapıyla değerlendirilmektedir. Çalışmada kullanılan bakterilerin dirençlilikleri zon çapları ile değerlendirilmiş ve aşağıdaki çizelge 4.13’de yorum kriterleri belirtilmiştir.

Çizelge 4.13. Yorum kriterlerinin gösterilmesi

Simgeler	MİK (mg/l)	Zon çapı (mm)
Duyarlı (S)	< = 4	> = 20
İntermediate (I)	8-16	15-19
Dirençli (R)	> = 32	< = 14

Yukarıdaki bütün tablolar bu çizelge'deki veriler bazında düzenlenmiştir. Bu çizelgeye göre zon çapı 20 mm'de yüksek veya eşit zon çapı oluşturan bakteriler kullanılan antibiyotiklere duyarlı, 15 ila 19 mm arasında artmış dozda duyarlı yani orta dirençli, 14 mm'den küçük ve ya eşit değer gösterirse dirençli olarak tanımlanmaktadır.

Duyarlı kategorisine (S) dahil olan bakteriler izolatın oluşturduğu enfeksiyonun ilacın standart dozları ile tedavi olma olasılığının yüksek olduğunu göstermektedir.

Artmış dozda duyarlı yani orta dirençli (I) kategorisine dahil olan bakteriler enfeksiyon bölgesinde mikroorganizma ile antibiyotik temasının artırılması (doz artımı, enfeksiyon yeri nedeniyle antibiyotiğin yoğunlaşması, antibiyotik veriliş yolu ve süresinin değerlendirilmesi gibi) ile mikroorganizmaya bağlı enfeksiyonun tedavisinde başarı sağlama olasılığını tanımlamaktadır.

Dirençli (R) kategorisine dahil olan bakteriler ilacın dozu artırılrsa bile enfeksiyonun tedavisinde başarısızlık olasılığının yüksek olduğunu göstermektedir.

Disk difüzyon testi sonucunda bakterilerin antibiyotiklere duyarlı, orta dirençli ve dirençli olarak aşağıdaki tabloda gösterilmiştir.

Çizelge 4.9. Toprak+leonardit karışımından izole edilen *Bacillus* sp. bakterilerin antibiyotik dirençliliği

Bakteri türleri	Gübre oranları	Günler	Antibiyotikler				
			P	OX	S	VA	AM
<i>Bacillus lentus</i>	275	BT-1	R	R	I	I	R
		1. gün	R	R	I	R	R
	1/6	7. gün	R	R	I	R	R
		30. gün	R	R	R	R	R
		1. gün	R	R	I	I	R
	1/10	7. gün	R	R	I	I	R
		30. gün	R	R	R	I	R
		1. gün	R	R	I	I	R
	1/12	7. gün	R	R	I	I	R
		30. gün	R	R	I	I	R
	276	BT-2	R	R	I	I	R
		1. gün	R	R	I	I	R
<i>Bacillus subtilis</i>	1/6	7. gün	R	R	I	I	R
		30. gün	R	R	I	I	R
		1. gün	R	R	I	I	R
	1/10	7. gün	R	R	I	I	R
		30. gün	R	R	I	I	R
		1. gün	R	R	I	I	R
	1/12	7. gün	R	R	I	I	R
		30. gün	R	R	I	I	R
	279	BT-3	R	R	I	I	R
		1. gün	R	R	I	R	R
	1/6	7. gün	R	R	I	R	R
		30. gün	R	R	R	R	R
<i>Bacillus licheniformis</i>		1. gün	R	R	I	I	R
	1/10	7. gün	R	R	I	I	R
		30. gün	R	R	I	I	R
		1. gün	R	R	I	I	R
	1/12	7. gün	R	R	I	I	R
		30. gün	R	R	I	I	R

Bacillus türlerinin tümünün Penicillin, Oxacillin, ve Ampicillin antibiyotiklerine karşı dirençli olması nedeniyle leonardit oranı ve süreye bağlı dirençlilik değişimi tespit edilmemiştir.

B. subtilis suşunda Streptomycin antibiyotiğine karşı dirençlilik değişimi görülmezken, *B. lentus* suşun da ise 1/6 ve 1/10 oranı karışımında Streptomycin antibiyotiğine karşı 30. günde dirençlilikte artış görülmüştür. *B. licheniformis* suşunun ise sadece 1/6 oranı leonardit karışımında 30. günde Streptomycin antibiyotiğine dirençlilik seviyesi intermediate'den resistant seviyesine artmıştır.

B. lentus ve *B. licheniformis* suşlarında Vancomycin antibiyotiğine karşı 1/6 karışım oranında dirençlilik artışı görülmüştür.

Şenkaya (2014), yaptığı çalışmasında Balıkesir ilinin Bigadiç ilçesinde toprak örneklerinden elde ettiği 13 izolatın antibiyotik dirençliliğini belirlemiştir. Oluşan en yüksek dirençlilik sırasıyla; sefotaksim (%53,84), okasilin (%53,84), metisilin (%46,15), amfisilin ve 66 66 sulbaktam (%30,76), eritromisin ve kloromfenikol (%7,69) antibiyotiklerine karşı olarak bulunmuştur. Yazıcıoğlu (2010), Farklı toprak örneklerinden izole ettiği endospor oluşturan *Bacillus* sp. izolatlarının antibiyotik dirençliliğini belirlemiştir. Buna göre izolatları sırasıyla %47,82'si sefotaksim, %21,11'i amfisilin, %10,55'inin tetrasiklin, %8,07'sinin klindamisin, %7,45'i vankomisin, %6,83'ü rifamisim, %4,96'sı streptomisin, %3,72'si eritromisin, %2,48'i kloramfenikol ve %0,62'si imipenem antibiyotiklerine karşı dirençli olarak bulunmuştur.

Çizelge 4.10. Toprak+ Amonyum sülfat karışımından izole edilen *Bacillus* sp. bakterilerin antibiyotik dirençliliği

Bakteri türleri	Gübre oranları	Günler	Antibiyotikler				
			P	OX	S	VA	AM
<i>Bacillus lentus</i>	1/6	1. gün	R	R	I	R	R
		7. gün	R	R	I	R	R
		30. gün	R	R	I	R	R
	1/10	1. gün	R	R	I	R	R
		7. gün	R	R	I	R	R
		30. gün	R	R	I	R	R
	1/12	1. gün	R	R	I	R	R
		7. gün	R	R	I	R	R
		30. gün	R	R	I	R	R
<i>Bacillus subtilis</i>	1/6	1. gün	R	R	R	R	R
		7. gün	R	R	R	R	R
		30. gün	R	R	R	R	R
	1/10	1. gün	R	R	R	R	R
		7. gün	R	R	R	R	R
		30. gün	R	R	R	R	R
	1/12	1. gün	R	R	I	R	R
		7. gün	R	R	R	R	R
		30. gün	R	R	R	R	R
<i>Bacillus licheniformis</i>	1/6	1. gün	R	R	R	I	R
		7. gün	R	R	R	R	R
		30. gün	R	R	R	R	R
	1/10	1. gün	R	R	I	I	R
		7. gün	R	R	I	R	R
		30. gün	R	R	R	R	R
	1/12	1. gün	R	R	I	I	R
		7. gün	R	R	I	R	R
		30. gün	R	R	R	R	R

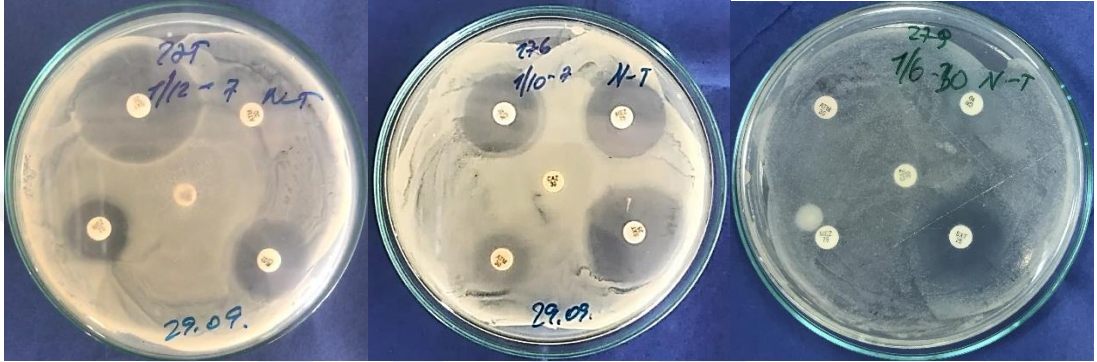
Çalışmada topraklardan elde edilen *Bacillus* suşlarının Penicillin, Oxacillin, ve Ampicillin antibiyotiklerine karşı dirençli olmaları nedeniyle toprak+amonyum sülfat karışımlarının bakterinin bu antibiyotiklere karşı olan duyarlılıkları üzerine etkileri tespit edilmemiştir.

Aynı durum *B. lentus* ve *B. subtilis* için Vancomycin antibiyotiği için de geçerlidir. *B. licheniformis* suşunun amonyum sülfat ile 1/6, 1/10, 1/12 karışım oranlarında Vancomycin antibiyotiğine karşı 1. günde orta seviyeye olan dirençlilik oranı, 7. ve 30. gün sonunda dirençli durumuna dönmüştür.

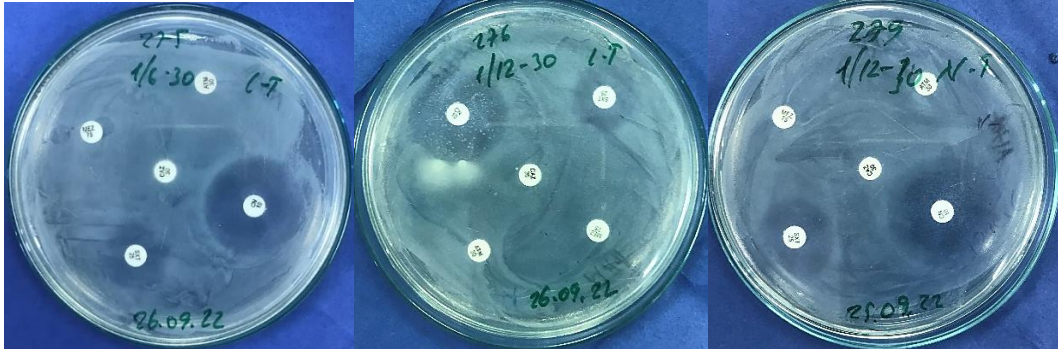
B. lentus suşunda amonyum sülfat karışımında Streptomycin antibiyotiğine duyarlılıkta bir değişikliğe neden olmazken, *B. subtilis* ve *B. licheniformis* suşlarında 30. günde dirençlilikte bir artış görülmektedir.

Aslım vd. (2002), tarafından yapılan bir çalışmada, topraktan izole edilen 30 adet *Bacillus* izolatlarını, *B. firmus*, *B. subtilis*, *B. megaterium*, *B. sphaericus*, *B. thuringiensis*, *B. pumilus* ve *Bacillus* spp. olarak tanımlamış ve bu izolatların amfisilin, kloramfenikol, eritromisin, gentamisin, sefalotin, tetrasiklin, sulbaktam, vankomisin, penisilin G'ye karşı antibiyotik duyarlılıklarını incelemişlerdir. Sonuçlara göre tüm suşların penisiline dirençli, vankomisine duyarlı olduklarını, izolatların %76'sının amfisiline, %20'sinin eritromisine, %3'unun kloramfenikole ve %7'sinin tetrasikline karşı dirençli olduğunu bildirmişlerdir. Luna vd.: (2007), 95 tane *Bacillus* spp. izolatının 24 farklı antibiyotiğe karşı duyarlılık durumunu sensititre otomatize mikrodilüsyon ve E-test yöntemi ile araştırmışlardır. Çalışılan 18 tane *B. anthracis* suşunun 3'ünün eritromisine azalmış duyarlı, suşların tamamının amfisilin, penisilin, tetrasiklin, kloramfenikol, vankomisin, gentamisin, rifampisin, klindamisin, kunipristin/dalfopristin ve kinolonlara duyarlı, kotrimoksazole karşı dirençli olduğunu bildirmişlerdir.

Pseudomonas sp. bakterilerinin antibiyotik dirençlilik durumlarının belirlenmesi için Mezlocillin, Trimethoprim sulfamethoxazole, Gentamisin, Aztreoman ve Ceftazidime diskleri kullanılmıştır. Bu antibiyotik diskler saf topraktan izole edilen ve 1., 7., 30. gün toprak+leonardit, toprak+ amonyum sülfat karışımlarından elde edilen bakterilere uygulanmıştır. Bu çalışmalara ait petri görüntüleri aşağıdaki şekil 4.15 ile 4.16’da ve çizelge 4.11 ile 4.12’de verilmiştir.



Şekil 4.15. Toprak+amonyum sülfat karışımlarından elde edilen bazı *Pseudomonas* suşlarının antibiyotik duyarlılık petri görüntüleri



Şekil 4.16. Toprak+leonardit karışımlarından elde edilen bazı *Pseudomonas* suşlarının antibiyotik duyarlılık petri görüntüleri

Çizelge 4.11. Toprak+ leonardit karışımından izole edilen *Pseudomonas sp.* bakterilerin antibiyotik dirençliliği

Toprak No'su	Günler	Kodlar	Antibiyotikler				
			MEZ	SXT	GN	ATM	CAZ
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	275	PT-1	R	I	I	R	R
		1. gün	R	R	I	R	R
	1/6	7. gün	R	R	I	R	R
		30. gün	R	R	R	R	R
	1/10	1. gün	R	R	I	R	R
		7. gün	R	R	I	R	R
		30. gün	R	R	R	R	R
		1. gün	R	R	I	R	R
	1/12	7. gün	R	R	I	R	R
		30. gün	R	R	R	R	R
<i>Pseudomonas putida (1)</i>	276	PT-2	R	R	I	R	R
		1. gün	R	I	I	R	R
	1/6	7. gün	R	I	I	R	R
		30. gün	R	R	I	R	R
	1/10	1. gün	R	I	I	R	R
		7. gün	R	I	I	R	R
		30. gün	R	I	I	R	R
		1. gün	R	I	I	R	R
	1/12	7. gün	R	I	I	R	R
		30. gün	R	I	I	R	R
<i>Pseudomonas putida (2)</i>	279	PT-3	R	R	I	R	R
		1. gün	R	R	I	R	R
	1/6	7. gün	R	I	I	R	R
		30. gün	R	I	I	R	R
	1/10	1. gün	R	R	I	R	R
		7. gün	R	I	I	R	R
		30. gün	R	I	I	R	R
		1. gün	R	R	I	R	R
	1/12	7. gün	R	I	I	R	R
		30. gün	R	I	I	R	R

Toprak+leonardit karışımlarından elde edilen *Pseudomonas* suşlarının Mezlocillin, Aztreonam ve Ceftazidime antibiyotiklerine karşı dirençli oldukları görülmüş ve olmaları nedeniyle karışım oranı ve bekleme süresinin etkisi tespit edilmemiştir. *P.putida* suşlarında ise antibiyotik duyarlılıkta bir etkileri görülmemiştir. *P. flourescens* suşlarında ise toprak+leonardit karışımlarında elde edilen suşların 30. Gün sonunda dirençlilikte artışa neden olduğu görülmüştür.

P.flourescens suşunun Trimethoprim Sulfamethoxazole antibiyotiğine karşı dirençli olduğu tespit edilmiştir. *P. putida* (1) suşunda 1/6 oranında karışımda 30. günde direnç artmış, *P. putida* (2) suşunda ise 1. gün dirençli olan suş, 7. ve 30. günde her 3 karışım oranında orta seviyyede dirençli bulunmuştur.

P.putida suşlarının Gentamycin antibiyotiğine karşı duyarlılıkta değişikliğe neden olmazken, *P. flourescens* suşunda ise 1/6, 1/10, 1/12 oran karışımda 1. ve 7. günde orta seviyyede dirençliyken, 30. günde ise dirençlilikte artış görülmüştür.

Karlowsky vd (2002) araştırmalarında kullandıkları *Pseudomonas* türüne ait susların %82,9'una aminoglikozid grubu antibiyotiklerden özellikle gentamisinin etkili olduğunu rapor etmişlerdir. Yine bir başka çalışmada Hancock ve Speert (2000) *P. aeruginosa*'nın aminoglikozid grubu antibiyotiklerden gentamisine karşı duyarlı olduklarını belirtmişlerdir. Shibl vd (1997) kullandıkları tüm *Pseudomonas* suslarına aminoglikozidlerden gentamisin ve saftazidim antibiyotiklerinin etkili olduklarını bildirmişlerdir.

Jayaswal ve ark. (1990), antibiyotik duyarlılık çalışmasında, *Pseudomonas* RJ2 izolatının, klorofenikole karşı duyarlı olduğu; ampisilin, penisillin ve streptomisine karşı ise dirençli olduğunu belirtilmiştir.

Sindhu ve ark. (1999), patojenik fungide *Pseudomonas* spp.'nin antagonistik etkisini incelemek için yaptıkları çalışmalarında, *Pseudomonas* spp.'lerin antibiyotik dirençliliğini araştırmışlar ve *Pseudomonas* izolatlarından 6 tanesinin 20, 50, 100 ve 200 µg/ml-1'lik dozlardaki ampisilin, kloromfenikol ve streptomisine duyarlılıklarını incelemişlerdir. Bu sonuca göre ampisilin ve kloromfenikolün 200 µg/ml-1'lik dozlarına 6 izolatın dirençli olduğu, ancak iki izolatın streptomisinin 200 µg/ml-1'lik dozuna dirençsiz olduğunu rapor etmişlerdir.

**Çizelge 4.12. Toprak+ Amonyum sülfat karışımından izole edilen
Pseudomonas bakterilerin antibiyotik dirençliliği**

Toprak No'su	Günler	Kodlar	Antibiyotikler				
			MEZ	SXT	GN	ATM	CAZ
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	1/6	1. gün	I	R	I	R	R
		7. gün	I	R	R	R	R
		30. gün	R	R	R	R	R
	1/10	1. gün	I	R	I	R	R
		7. gün	I	R	I	R	R
		30. gün	R	R	I	R	R
	1/12	1. gün	I	R	S	R	R
		7. gün	I	R	S	R	R
		30. gün	R	R	S	R	R
<i>Pseudomonas putida</i> (1)	1/6	1. gün	I	R	I	S	R
		7. gün	I	R	I	S	R
		30. gün	R	R	I	I	R
	1/10	1. gün	R	R	I	S	R
		7. gün	R	R	I	S	R
		30. gün	R	R	I	S	R
	1/12	1. gün	R	R	S	S	R
		7. gün	R	R	S	S	R
		30. gün	R	R	S	S	R
<i>Pseudomonas putida</i> (2)	1/6	1. gün	I	R	S	R	R
		7. gün	R	R	S	R	R
		30. gün	R	R	I	R	R
	1/10	1. gün	I	R	S	R	R
		7. gün	R	R	S	R	R
		30. gün	R	R	I	R	R
	1/12	1. gün	I	R	S	R	R
		7. gün	I	R	S	R	R
		30. gün	R	R	S	R	R

Toprak+amonyum sülfat karışımlarında elde edilen *Pseudomonas* suşlarının Trimethoprim Sulfamethoxazole ve Ceftazidime antibiyotiğine karşı dirençli olduğu tespit edilmiştir.

P. flourescens suşunun her 3 karışımda Mezlocillin antibiyotiğine karşı 30. günde dirençlilik artışı tespit edilmiştir. *P.putida* suşlarında ise Mezlocillin antibiyotiğine karşı amonyum sülfat ile muamele sonrası dirençlilik artışı gözlemlenmiştir.

P.flourescens suşunun Aztreonam antibiyotiğine karşı tüm karışımlarda ve bekleme süreleri sonrası dirençli olduğu görülmüştür. Aynı suшта gentamycin antibiyotiğine karşı amonyum sülfat oranı azaldıkça dirençliliklerde azalma belirlenmiştir.

Bu durum *P. putida* suşları içinde benzer olup, gentamycin antibiyotiğine karşı amonyum sülfat oranı azaldıkça dirençlilik zayıflamıştır. *P. putida* (1) v (2) suşları Aztreonam antibiyotiğine karşı farklı bir duyarlılık göstermiş olup, *P.putida* (1) ATM'ye duyarlı bulunurken: *P. putida* (2) dirençli bulunmuştur.

Toprak+amonyum sülfat karışımlarında elde edilen *Pseudomonas* suşlarının Trimethoprim Sulfamethoxazole ve Ceftazidime antibiyotiğine karşı dirençli olduğu tespit edilmiştir.

P. flourescens suşunun her 3 karışımda Mezlocillin antibiyotiğine karşı 30. günde dirençlilik artışı tespit edilmiştir. *P.putida* suşlarında ise Mezlocillin antibiyotiğine karşı amonyum sülfat ile muamele sonrası dirençlilik artışı gözlemlenmiştir.

P.flourescens suşunun Aztreonam antibiyotiğine karşı tüm karışımlarda ve bekleme süreleri sonrası dirençli olduğu görülmüştür. Aynı suшта gentamycin antibiyotiğine karşı amonyum sülfat oranı azaldıkça dirençliliklerde azalma belirlenmiştir.

Bu durum *P. putida* suşları içinde benzer olup, gentamycin antibiyotiğine karşı amonyum sülfat oranı azaldıkça dirençlilik zayıflamıştır. *P. putida* (1) v (2) suşları Aztreonam antibiyotiğine karşı farklı bir duyarlılık göstermiş olup, *P.putida* (1) ATM'ye duyarlı bulunurken: *P. putida* (2) dirençli bulunmuştur.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez çalışmasında Muğla ilinin farklı 3 bölgesinden alınan toprak örnekleri ve organik gübre olarak leonardit, kimyasal gübre olarak amonyum sülfat kullanılmıştır. Bu toprak ve toprak+gübre karışımlarından elde edilen *Bacillus* ve *Pseudomonas* izolatları çalışmaya alınmıştır.

Demir, yaptığı bir çalışmada, Kahramanmaraş ilinin organik çözücülerle kirlenen bölgelerinden toprak örnekleri toplamıştır. Petri kutularında gelişen farklı özellikteki 88 adet koloni elde etmiştir. Bunların içerisinde de gelişme gösteren 57 izolata biyokimyasal, morfolojik, kültürel ve fizyolojik testler uygulayarak 32 tanesini *Bacillus*, 25 tanesini ise *Pseudomonas* cinsine dahil etmiştir (Demir, 2007). (tez 19) Yeşiltaş (2014), yaptığı çalışmasında Arkeolojik kazı toprağından 27 adet endospor oluşturan *Bacillus* grubu bakteri izole etmiştir. Bu bakterilere biyokimyasal testler uygulayarak 8 izolatu *Brevibacillus borstelensis*, 7 izolatu *B. cereus*, 6 izolatu *B. subtilis*, 1 izolatu *Paenibacillus macerans*, 1 izolatu *B. popillia*, 1 izolatu *B. polymyxa*, 2 izolatu *B. coagulans*, 1 izolatu *B. larvae* olarak belirlemiştir. Bir başka çalışmada Çolak (2008), seçtiğı Elektromanyetik dalga içeren baz istasyonları yakınlarından aldığı toprak örneklerinden 15 adet *Bacillus cereus* straini izole etmiştir.

Bu veriler farklılık göstermesine rağmen tez çalışmamızla bağdaşmaktadır.

İzolasyon çalışmaları sonucunda elde edilen izolatların API test kitleri ile fenotipik identifikasyonları gerçekleştirilmiştir. İdentifikasyon sonuçlarına göre 3 adet *Pseudomonas* (*P. fluorescens* 1 adet, *P. putida* 2 adet) ve 3 adet *Bacillus* (*B. lentus*, *B. subtilis*, *B. licheniformis*) suşu ile antibiyotik duyarlılık testlerine devam edilmiştir. *Bacillus spp.* bakterilerinin antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesi için Penicillin (P), Oxacillin (OX), Streptomycin (S), Vancomycin (VA), Ampicillin (AM) antibiyotik diskleri, *Pseudomonas spp.* bakterilerinin antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesi için Mezlocillin (MEZ), Trimethoprim sulfamethoxazole (SXT), Gentamicin (GN), Aztreonam (ATM), Ceftazidime (CAZ) antibiyotik diskleri

kullanılmıştır. Bakterilerin antibiyotik dirençlilik durumları CLSI M39-A4 standartlarına göre belirlenmiştir.

Günümüzde kullanılan antibiyotikler A. Fleming tarafından 1928'de *Penicillium chrysogenum*'dan elde edilen Penisilin antibiyotiği ile başlamıştır. Diğer yandan hem sağlık alanında hem de diğer alanlarda antibiyotiklerin gereksiz yere kullanılması antibiyotiklere karşı bakterilerin giderek dirençli hale gelmesini sağlamıştır.

Bacillus türlerinin tümünün Penicillin, Oxacillin, ve Ampicillin antibiyotiklerine karşı dirençli olması nedeniyle leonardit oranı ve süreye bağlı dirençlilik değişimi tespit edilmemiştir. *B. subtilis* suşunda Streptomycin antibiyotiğine karşı dirençlilik değişimi görülmezken, *B. lentus* suşun da ise 1/6 ve 1/10 oranı karışımında Streptomycin antibiyotiğine karşı 30. günde dirençlilikte artış görülmüştür. *B. licheniformis* suşunun ise sadece 1/6 oranı leonardit karışımında 30. günde Streptomycin antibiyotiğine dirençlilik seviyesi intermediate'den resistant seviyesine artmıştır. *B. lentus* ve *B. licheniformis* suşlarında Vancomycin antibiyotiğine karşı 1/6 karışım oranında dirençlilik artışı görülmüştür.

Çalışmada topraklardan elde edilen *Bacillus* suşlarının Penicillin, Oxacillin, ve Ampicillin antibiyotiklerine karşı dirençli olmaları nedeniyle toprak+amonyum sülfat karışımlarının bakterinin bu antibiyotiklere karşı olan duyarlılıkları üzerine etkileri tespit edilmemiştir. Aynı durum *B. lentus* ve *B. subtilis* için Vancomycin antibiyotiği için de geçerlidir. *B. licheniformis* suşunun amonyum sülfat ile 1/6, 1/10, 1/12 karışım oranlarında Vancomycin antibiyotiğine karşı 1. günde orta seviyeye olan dirençlilik oranı, 7. ve 30. gün sonunda dirençli durumuna dönmüştür. *B. lentus* suşunda amonyum sülfat karışımında Streptomycin antibiyotiğine duyarlılıkta bir değişikliğe neden olmazken, *B. subtilis* ve *B. licheniformis* suşlarında 30. günde dirençlilikte bir artış görülmektedir.

Toprak+leonardit karışımlarından elde edilen *Pseudomonas* suşlarının Mezlocillin, Aztreonam ve Ceftazidime antibiyotiklerine karşı dirençli oldukları görülmüş ve olmaları nedeniyle karışım oranı ve bekleme süresinin etkisi tespit edilmemiştir. *P. putida* suşlarında ise antibiyotik duyarlılıkta bir etkileri görülmemiştir. *P. fluorescens* suşlarında ise toprak+leonardit karışımlarında elde edilen suşların 30. Gün sonunda dirençlilikte artışa neden olduğu görülmüştür. *P. fluorescens* suşunun Trimethoprim Sulfamethoxazole antibiyotiğine karşı dirençli olduğu tespit edilmiştir. *P. putida* (1) suşunda 1/6 oranında karışımında 30. günde direnç artmış, *P. putida* (2)

suşunda ise 1. gün dirençli olan suş, 7. ve 30. günde her 3 karışım oranında orta seviyyede dirençli bulunmuştur. *P.putida* suşlarının Gentamycin antibiyotiğine karşı duyarlılıkta değişikliğe neden olmazken, *P. flourescens* suşunda ise 1/6, 1/10, 1/12 oran karışımında 1. ve 7. günde orta seviyyede dirençliyken, 30. günde ise dirençlilikte artış görülmüştür.

Toprak-leonardit, ve toprak-amonyum sülfat karışımlarından elde edilen *Pseudomonas* suşlarının Ceftazidime antibiyotiğine dirençli olduğu tespit edilmiştir. *P. flourescens* suşlarının Trimethoprim Sulfamethoxazole antibiyotiğine her iki karışımında dirençli oldukları görülürken, toprak+leonardit karışımından elde edilen *P. putida* suşları toprak+amonyum sülfat karışımından elde edilenlere göre daha duyarlı bulunmuştur.

Toprak-leonardit karışımlarından elde edilen *P. flourescens* suşlarında zamana bağlı Gentamycin antibiyotiğin karşı direnci artarken, bu toprak+amonyum sülfat karışımında sadece 1/6 karışımında görülmüştür. Bu suş için Mezlocillin antibiyotiğine karşı dirençliliği muamele süresi arttıkça arttığı görülmüştür.

Her iki gübre ile hazırlanan karışımlardan elde edilen *Bacillus* suşlarının farklı karışım ve bekleme süreleri sonunda Penicillin, Ampicillin, Oxacillin antibiyotiklerine dirençli oldukları görülmüştür. Toprak+amonyum sülfat karışımlarından elde edilen *Bacillus* suşlarının toprak+leonardit karışımlarından elde edilenlere göre Streptomycin ve Vancomycin antibiyotiklerine karşı dirençlilikleri daha yüksek oranda görülmüştür. Bu bakteriler için Streptomycin ve Vancomycin antibiyotiklerine karşı anlamlı bir direnç artışı tespit edilememiştir.

Yapılan tez çalışması sonucunda leonardit gübresiyle toprak karışımlarında antibiyotiklere karşı direnç durumlarında amonyum sülfata nazaran daha fazla artış olduğu söylenebilir.

6. KAYNAK ARAŞTIRMASI

Abriouel, H., Gálvez, A., López, R.L., Omar, N.B., (2007) *Bacteriocin-based strategies for food biopreservation*, International Journal of Food Microbiology 120: 51-70s.

Acea, M.J. ve T. Carballas (1996) *Microbial response to organic amendments in a forest soil*, Bioresource Technology, 57: 193-199s.

A. G. Stover, A. Driks (1999) *Identification of Bacillus subtilis SipW as a Bifunctional Signal Peptidase That Controls Surface-Adhered Biofilm Formation*, Journal of Bacteriology, 181: 1664-1672s.

Ahmad, F., Ahmad I., Khan, M.S. (2008) *Screening of Free-Living Rhizospheric Bacteria for Their Multiple Plant Growth-promoting Activities*, Microbial Araes., 163:173-181s.

A. Logan, P.C.B. (2002) *Turnbull, Bacillus and Recently Derived Genera*, In: PR Murray, Rogel Berkeley, Blackwell Science LTD. Blackwell Publishingh, 305s.

Aktuğlu, T. (1997) *Giriş ve Genel Bilgiler*, Aktuğlu, Y. (Editör), *Praktike Antibiyotik Kullanımı*, Sempozyum dizisi Yayın 1: 11-53s.

Akman, Y., Ketencioğlu, O., Evren, H., Kurt, L., Düzenli, S.(2000) *Çevre Kirliliği Çevre Biyolojisi*, Palme Yayıncılık, Ankara, 139s.

Alev Usta Ak (2017) *Bacillus sp. Suşlarının patojen bakterilere karşı antimikrobiyal aktivitesi, antimikrobiyal madde üretimi üzerine bazı besinsel ve fiziksel faktörlerin etkisi, kısmi saflaştırılması ve karakterizasyonu*, Doktora Tezi, Bursa, 116s.

Angel Jenifer, M.R., Reena, A., Aysha, O. S., Valli, S., Nirmala, P., Vinothkumar, P. (2013) *Isolation of siderophore producing bacteria from rhizosphere soil and their antagonistic activity against selected fungal plant pathogens*, 2(1): 59-65s.

Anonymous, Health, Safety & Environment, Heavy Pesticide Contamination in China, 2009. www.ebscohost.com.

Aslım, B., Sağlam, N., Beyatlı, Y. (2002) *Determination of some properties of Bacillus isolated from soil*, Turkish Journal of Biology, 26: 41-48s.

Aşkın T., Kızılyaka R., Gülser C., Bayraklı B. (2004) *On dokuz Mayıs Üniversitesi topraklarının Bazı Mikrobiyolojik özellikleri*, 2004, On dokuz Mayıs Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 19(1): 31-36s.

Bangera M. G., Thomashow L. S. (1996) *Characterization of a Genomic Locus Required for Synthesis of the Antibiotic 2,4-Diacetylphloroglucinol by the Biological Control Agent Pseudomonas fluorescens*, 02-87 Molecular Plant Microbe Interac., 9: 83-90s.

Bergone-Berezin, E., Towner KJ. (1996) *Acinetobacter spp. As nosocomial pathogens: Microbiological, clinical and epidemiological features*, Clin Microbial Rev., 9: 148-165s.

Bergsma Vlamı M., Prins M.E. ve Raaijmakers J. M. (2005) *Influence of Plant Species on Population Dynamics, Genotypic Diversity and Antibiotic Production in the Rhizosphere by Indigenous Pseudomonas spp.* FEMS Microbiol, Ecol, 52: 59-69s..

Bülbüloğlu Ö. (2000) *Çeşitli toprak örneklerinden izole edilen Bacillus thuringiensis' lerin izolasyonu, karakterizasyonu ve insektisidal etkilerinin belirlenmesi*, Yüksek Lisans Tezi, KTU Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon, 11s.

Cappuccino, J. G., Sherman, N. (1992) *Microbiology, a Laboratory Manual, Third Edition*, Rockland Community College, Suffern, New York.

Carson L.A., Favero M.S., Bond W.W. ve Petersen N.J. (1973) *Morphological, Biochemical and Growth Characteristics of Pseudomonas cepacia from Distilled Water*, Appl. Microbiol., 25(3): 476-483s.

Cash P. (1998) *Characterisation of bacterial proteomes by two-dimensional electrophoresis*, Analytica Chimica Acta, 372:121-145s.

Chatterjee S., Chatterjee D. K., Jani R. H., Blumbach J., Ganguli B. N., Klesel N., Limbert M., Seibert G. (1992) *Mersacidin, a new antibiotic from Bacillus. In vitro and in vivo antibacterial activity*, The Journal of Antibiotics, 45: 839-845s.

C. Hill (1995) *Bacteriocins, Natural Antimicrobials from Microorganisms*, New Methods for Food Preservation, Blackie Academic&Professional, London, 457s.

Chythanya R., Karunasagar Indrani, Karunasagar Iddya (2002) *Inhibition of shrimp pathogenic vibrios by marine Pseudomonas I.- 2 strain*. Aquaculture, Cilt 208. 1-10s.

Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) (2014) *Analysis and Presentation of Cumulative Antimicrobial Test Data; Approved Guideline*, 4th ed. CLSI document M39-A4, Wayne PA,

Cook R. J., Baker K. F. (1983) *The Nature and Practice of Biological Control of Plant Pathogens*, St Paul, MN: APS Press, 539s.

Cowan S.T., Holt J.G., Liston J., Murray R.G.E., Niven C.F., Ravin A.W. ve Stanier R.Y. (1974) *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, Buchanan R.E. ve Gibbons N.E. (editörler), *The Williams and Wilkins Company*, 8 Baskı, Baltimore, London, 7: 217-243s.

C. Perez, C. Suarez, ve G.R. Castro (1993) *Antimicrobial Activity Determined in Strains of Bacillus circulans Cluster*, Folia Microbiology, 38: 25-28s.

Çelik Sevim, E., Alpay Karaoğlu, Ş., Sevim A., Özgümüş O. B., (2006) *İçme sularından izole edilen Bacillus suşlarının identifikasyonu ve antibiyotiklere direnç profilleri*, Türk Mikrobiyol Cem Derg. 36 (4) : 219-223s.

Çolak A.K. (1980), *Toprak biyolojisi Ders notları*, 1980, Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi yayınları, 451s.

Çolak, C., (2008), *Elektromanyetik Dalgaların Bacillus cereus İzolatları Üzerine Etkisinin İncelenmesi*, Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir, 41-66s.

Demnerova K., Machova M., Spevakova V., Baranova K., Kochankova L., Lovecka P., Ryslava E., Macek T. (2005) *Two approaches to biological decontamination of groundwater and soil polluted by aromatics-characterisation of microbial populations*, International Microbiology, Cilt 8, 205-211s.

Demirtürk B. (2013) *Diş Hekimliğinde Sık Kullanılan Antibiyotiklerin Gebelikte Teratojen Etkileri*, Bitirme tezi, Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, İzmir, 38s.

Demir B. (2007) *Kahramanmaraş İlinden Toplanan Toprak Örneklerinden Organik Solvent Tolere Edebilen Mikroorganizmaların İzolasyonu ve Tanımlanması*, Yüksek Lisans Tezi, Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kahramanmaraş, 37-42s.

Dinesh R., R.P. Dubey ve G. Shyam Prasad (1998) *Soil microbial biomass and enzyme activities as influenced by organic manure incorporation into soils of a rice-rice system*, J.Agr. Crop Sci.,181: 173-189s.

Duygu Odabaş (2011) *Ordu ili ve ilçelerinden toplanan toprak numunelerinden Bacillus sp. Suşlarının izolasyonu ve insektisidal etkilerinin belirlenmesi*, Yüksek lisan tezi, Ordu, 69s.

Ekşi F., Bayram A., Balcı İ., Özer G. (2007) *Pseudomonas aeruginosa suşlarında indüklenbilir beta-laktamaz aktivitesinin ve antibiyotiklere direncin araştırılması*, Türk Mikrobiyol Cem Dergisi, 37(3): 142-146s.

E. Katz, A. L. Demain (1977) *The peptide antibiotics of Bacillus: chemistry, biogenesis, and possible functions*, 41: 449-474s.

Egemen Ö. (1999) *Çevre ve Su Kirliliği*, Ege Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi, İzmir, 50s.

Eltem R., Uçar F. (1998) *Bir soda gölü olan Denizli Acıgöl'den izole edilmiş 23 Bacillus suşunun antimikrobiyal aktivite spektrumlarının saptanması*, Kükem Dergisi, 21: 57-64s.

Fadime Topçal, Metin Dıgırak, Recep Gündoğan (2014) *Topraktan izole edilen Bacillus türlerinin tanımlanması ve bakteriosin üretimlerinin belirlenmesi*, Adıyaman Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi, 4(2): 57-67s.

Fravel D.R. (1988) *Role of Antibiosis in the Biocontrol of Plant Diseases*. Annu. Rev. Phytopathol. 26: 75-91s.

Fravel D.R. (2005) *Commercialization and implementation of biocontrol*. Ann. Rev. Phytopathol. 43: 337-359s.

Guo Y., Zheng H., Yang Y., Wang H., 2007. *Characterization of Pseudomonas corrugata strain P34 Isolated from Soil in Beijing as a Potential Biocontrol Agent*, 55: 247-253s.

- Güven K.C. (2005) *Deniz Kirliliği*, Tüdev Yayınları, İstanbul, 76s.
- Gürkan M.O., Ünal G., İnsektisitler (2001) *Kimyasal Yapıları, Toksikolojileri ve Ekotoksikolojileri*, Ethemoglu Ofset Matbacılık, Ankara, 102-125s.
- Hafeez F.Y., Yasmin, J., Ariani D., Rahman M., Zafar Y., Malik K.A. (2006) *Plant Growth-Promoting Bacteria as Biofertilizer*. *Argon. Sustain. Dev.*, 26:143-150
- Hadas A. ve R. Portnoy (1994) *Nitrogen and carbon mineralization rates of composted manures incubated in soil*, *J. Environ Quality*, 23: 1184-1189s.
- Hancock R.E.W. and Speert D.P. (2000) *Antibiotic Resistance in Pseudomonas aeruginosa: Mechanisms and Impact on Treatment, Drug Resist, Update.*, 3: 247-255s.
- Hariprasad P., and Nijanjana S.R. (2008) *Isolation and Characterization of Phosphate Solubilizing Rhizobacteria to Improve Plant Health of Tomato*, *Plant Soil*.
- Hass D. and Defago G. (2005) *Biological Control of Soil-Borne Pathogens by Fluorescent Pseudomonads*, *Nat. Rev. Microbiol.* 3: 307–319s.
- Hatice Katı, Burak Karaca, Şebnem Hazal Gülşen (2016) *Topraktan izole edilen Bacillus türlerinin tanımlanması ve biyolojik özelliklerinin araştırılması*, *SAÜ Fen Bil. Der.*, 20(2): 281-290s.
- Herberts S.J. (1998) *Farmyard Manure Crop Dairy, livestock News*. University of Massachusetts Amherst USA, 311s.
- Hoffmann (1986) *Bodenenzyme als Charakteristika Biologischen Aktivität und von Stoffumsätzen in B.den. II. Seminar: Die Anwendung Enzymatischer und Mikrobiologischer Methoden in der Bodenanalyse*, 5-6 Juni, Linz.
- Holt G. J., Krieg N. R., Sneath P. H., Staley J. T., Williams S. T. (1994) In: *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, ninth ed. The Williams and Wilkins Pub., M. D., USA.
- Homma Y., S., Hirayama Z., Konno F., Shirahama H., Suzuki T. (1989) *Production of Antibiotics by Pseudomonas cepacia as an Agent for Biological Control of Soil-borne Plant Pathogens*, *Soil Biol. Biochem.*, 21: 723-728s.

Howell C.R., Stiponovic, R.D. (1980) *Suppression of Pythium ultimum Induced Damping off of Cotton Seedling by Pseudomonas fluorescens and its Antibiotics*. *Phytopathol.*, 70: 712-715s.

IOC Spor, Çevre ve Sürdürülebilir Gelişim Rehberi (2008) S:14-15s.

Işıl Demirtaş, Nuri Arı, Ahmet Apracıoğlu, Harun Kaya, Cevdet Özkan (2005) *Değişik organik kökenli gübrelerin kimyasal özellikleri*, Batı Akdeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, Antalya, 22(2): 47-52s.

İnci Güler (2010) *Topraktan Pseudomonas spp. izolasyonu ve antagonistik etkinliklerinin belirlenmesi*, Yüksek lisans Tezi, Harran Üniversitesi, Şanlıurfa, 94s.

Jakorekova S., Stevilkova T., Labuda R., Ondříčık P. (2001) *Influence of Xenobiotics on the Biological Soil Activity*. 5 tables; 1 ill., 12 ref. *Journal of Central European Agriculture (Croatia)*. 2(3-4): 191-198s.

Jayaswal R. K., Fernandez M. S., Schroeder III R.G., 1990. *Isolation and Characterization of a Pseudomonas Strain that Restricts Growth of Various Phytopathogenic Fungi*, *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 1053–1058s.

Jayaswal R.K., Fernandez M., Upadhyay R.S., Vısıhtın L., Kurz M., Webb. J., Rinehart K. (1993). *Antagonism of Pseudomonas cepacia against Phytopathogenic Fungi*. *Curr. Microbial.*, 26: 17-22s.

Joergensen R.G., Scheu S. (1999) *Response of soil microorganisms to the addition of carbon, nitrogen and phosphorus in a forest Rendzina Soil*. *Biology Biochem*, 31: 859-866s.

Jonasson S., Michelsen A., Schmidt I.K. (1996) *Microbial biomass C, N and P in two arctic soils and responses to addition of NPK fertilizer and sugar: Implications for plant nutrient uptake*, *Oecologia* 106, 507-515s.

Karlowisky J. A., Kelly L. J., Thornsberry C., Jones M. E., Evangelista A. T., Critchley I. A. ve Sahm D. F. (2002) *Susceptibility to Fluoroquinolones Among Commonly Isolated Gram Negative Bacilli in 2000: Trust and TSN Data for the United States*. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 19: 21-31s.

Keel C., Schnider U., Maurhofer M., Voisard C., Laville J., Burger P., Wirthner P., Hass D., Defago G. (1992) *Suppression of Root Diseases by Pseudomonas*

fluorescens CHA0: Importance of the Secondary Metabolite 2,4-Diacetylphloroglucinol, *Molecular Plant-Microbe Interactions* 5: 4-13s.

Kloepper J.W. (1991) *Plant Growth-Promoting Rhizobacteria as Biological Control Agents of Soil Borne Disease*. in: E.C. Tjamos, G. C. Papavizas And R.J. Cook (Eds), *The Biological Control of Plant Diseases – Progress and Challenges for The Future*. Nato ASI Series. 230plenum Press, New York. pp. 142-152s.

Klein Gunnewiek P. J. A., Lafeber P., Janse J. D., De Boer W., Spit B. E., Woldendorp J. W. (1998) *Antifungal Properties of Chitinolytic due Soil Bacteria*. *Soil Biol. Biochem*, 30(2): 193-203s.

Kloepper J. W., J. Leong , M. Teintze ve N. M. Schroth (1980) *Enhanced Plant Growth by Siderophores Produced by Plant Growth Promoting Rhizobacteria*. *Nature London*, 286: 885-886s.

Kloepper J. W., Lifshits R., Zablotowichz R. M. (1989) *Free-Living Bacterial Inokula for Enhancing Crop Productivity*, *Trends Biotechnol*. 7: 39-43s.

Leong J. (1986) *Siderophores: Their Biochemistry and Possible Role in the Biocontrol of Plant Pathogens*. *Annu Rev Phytopathol*, 24:187–209s.

Lindberg T., Granhall U. (1984) *Isolation and Characterization of Dihydrogen-Fixing Bacteria from The Rhizosphere of Temperate Cereals and Forage Grasses*, *Appl. Environ. Microbial.*, 48: 683-689s.

Louws F.S., Wilson M., Campbell H.L., Cuppels D..A., Jones J., Shoemaker P. B., Sahin F., Miller S. A. (2001) *Field Control of Bacterial Spot and Bacterial Speck of Tomato using a Plant Activator*. *Plant Dis*. 85:1-12s.

Lugtenberg B.J.J., Dekkers L., Bloembergen G. V. (2001) *Molecular Determinants of Rhizosphere Colonization by Pseudomonas*. *Annu. Rev. Phytopathol*, 39: 461-490s.

Luna V. A., King D. S., Gullledge J., Cannons A. C., Amuso P. T., Cattani J., (2007), *Susceptibility of Bacillus anthracis, Bacillus cereus, Bacillus mycoides, Bacillus pseudomycoides and Bacillus thuringiensis to 24 antimicrobials using Sensititre automated microbroth dilution and Etest agar gradient diffusion methods*, *J Antimicrob Chemother*, 60(3):555-67s.

Mehmet Ali Yetkin (2010) *Organik gübreler ve  nemi*, Samsun İl Tarım Müdürlüğü  ift i Eğitimi ve yayım Őubesi yayını, Nisan, Samsun.

Meryem Melike Karahan (2016) *Farklı sebze ve yetiŐdirildikleri toprak kaynaklı gram negatif bakteri suşlarında antibiyotik direnç ile ERIC-PCR profillerinin belirlenmesi*, Yüksek lisans tezi, Kahramanmaraş, 94s.

M. Ongena, P. Jacques (2008) *Bacillus lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol*. Trends Microbiology.,16: 115-125s.

M. M. J. Bennik, A. Verhuel, T. Abee, G. Naaktgeboren-Stoffels, L. G. M. Gorris, E. J. Smid (1997) Appl. Environ. Microbial, 63: 3628-3636s.

Muleta D., Assefa F., Garnhall U. (2007) *In vitro Antagonism of Rhizobacteria Isolated from Coffea arabica L. Against Emerging Fungal Coffee. Pathogens*, Eng. Life Sci., 7(6): 577-586s.

Nur Okur, H.H sn  Kayık io lu, G lhan Tun , Y ksel T zel (2007) *Organik tarımda kullanılan bazı organik gübrelerin topraktaki mikrobiyal aktivite üzerine etkisi*, Ege Üniversitesi Ziraat Fak. Dergisi, 44(2):65-80s.

Olivella M.A., Del Rio. J. C., J, Palacios M. A., Vairavamurthy, de las Heras (2002) *Characterization of Humic Acid From Leonardite Coal: An Integrated Study of PY – GC – MS – XPS and XANES Techniques*, Journal of Analytical and Applied Prolyses, 63: 59-68s.

Pandey A., Paln  L. M. S., Hebbar K.P. (2001) *Suppression of Damping-off in Maize Seedlings by Pseudomonas corrugata*. Microbiol. Res. 156: 191-194s.

Picard C., D  Cello F., Ventura M., Fan  R., Guckert A. (2000) *Frequency and Biodiversity of 2,4-Diacetylphloroglucinol-Producing Bacteria Isolated from the Maize Rhizosphere at Different Stages of Plant Growth*, Applied and Environmental Microbiology, 66: 948-955s.

Padem, H.,  cal, A. (1999) *Effect of humic acid applications on yield and soma characteristic of processing tomato*, Acta Horticulturae, 487: 159-63s.

Patel P. S., Huang S., Fisher S., Pirnik D., Aklonis C., Dean L., Meyers E., Fernandes P., Mayerl F. (1995) *Bacillaene, a novel inhibitor of procaryotic protein synthesis produced by Bacillus subtilis: production, taxonomy, isolation, physico-*

chemical characterization and biological activity, Journal of Antibiotics, 48: 997-1003s.

Perez C., Suarez C., Castro G. R. (1992) *Production of antimicrobials by Bacillus subtilis MIR 15*, Journal of Biotechnology, 26: 331-336s.

Perez C., Suarez C., Castro G. R. (1993) *Antimicrobial Activity Determined in Strains of Bacillus circulans Cluster*, Folia Microbiology, 38: 25-28s.

Pettit R.E. (2012) *Organic Matter, Humus, Humate, Humic Acid, Fulvic Acid, and Humin*. [www.calciumproducts.com/articles/Dr. Pettit Humate.pdf](http://www.calciumproducts.com/articles/Dr._Pettit_Humate.pdf).

Raaijmakers S., Weller D. M., ve Thomashow L. S. (1997) *Frequency of Antibiotic-Producing Pseudomonas spp. in Natural Environments*. Applied and Environmental Microbiology, 63: 881-887s.

Raaijmaker J. M., and Weller D. M. (2001) *Exploiting Genotypic Diversity of 2,4-diacetylphlorolucinol-Producing Pseudomonas spp. Characterization of Superior Root-Colonizing P. fluorescens strain Q8r1-96*. Appl. Environ. Microbiol., 67: 2545-2554s.

RCW. Berkeley, N. Logan (1997) *Bacillus, Alicyclobacillus and Paenibacillus*, Principles and Practice of Clinical Bacteriology, Chichester: Wiley; 185s.

Rosovitz M.J., Voskuil M.I., Chambliss G. H., (1998) Collier L., Balows, A. ve Susman, M. (editörler), *Bacillus, Topley and Wilson's Microbiology and Microbial Infections*, Systematic Bacteriology, 2 Cilt, 9nd Edition, Oxford University Pres, New York, 709-730s.

Serap Soyergin (2003) *Organik tarımda toprak verimliliğinin korunması, gübreler ve organik toprak iyileştiricileri*, Atatürk Bahçe kültürleri Merkez Araştırma Enstitüsü, Yalova, 32s.

Shibl A. M., Tawfic A. F. ve Ramadan, M. A. (1997) *Comparative Efficacy of Successive exposure of Pseudomonas aeruginosa to Gentamicin and Ceftazidime.*, International Journal of Antimicrobial Agents., 8: 257-261s.

Sindhu S. S., Gupta S.K, Dadarwal K.R., 1999. *Antagonistic Effect of Pseudomonas spp. on Pathogenic Fungi and Enhancement of Growth of Green Gram (Vigna radiata)*. 29: 62-68s.

Sibel Gülcan (2006) *Çeşitli kaynaklardan izole edilen Pseudomonas cinsi bakterilerinin ağır metal ve naftalin toleransı*, Yüksek lisans Tezi, Pamukkale Üniveristesi, Denizli, 95s.

Silvia J. (1996) *Mechanisms of Antibiotic Resistance*, Current Therapeutic Research., 57: 30-34s.

Singh A., Goering R.V., Simjee S., Foley S. L., Zervos M. J. (2006) *Application of molecular techniques to the study of hospital infection*, Clin Microbiol Rev., 19: 512-530s.

Sneath A.P. (1986) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2, Sneath, A.P., Mair, N.S., Sharge, M.S. ve Holt, J.G., Williams and Wilkins, Baltimore.

Sneh B., Dupler M., Elad Y. ve Baker R. (1984) *Chlamydospore Germination of Fusarium oxysporium f. sp. cucurmerinum as Affected by Fluorescent and Lytic Bacteria from Fusarium suppressive soils*, Phytopatology, 74: 1115-1124s.

Şahin Cenkseven (2006) *Doğu Akdeniz bölgesinde yetişen 2 farklı bitki toprağına eklenen saf bakteri kültürlerinin organik madde mineralizasyonuna etkisi*, Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi, Adana, 48s.

Şenkaya F., (2014) *Borlu Topraklardan Elde Edilen Endospor Oluşturan Basillerin İdentifikasyonu ve Bazı Yeteneklerinin Araştırılması*, Yüksek Lisans Tezi, Dumlupınar Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kütahya, 17-67s.

Tabak F. (1997) İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri, *Pratikte Antibiyotik Kullanımı Simpozyumu*, İstanbul, 81-90s.

Tanaka R., Sugimura I., Sawabe T., Yoshimizu M., Ezura Y. (2003) *Gut microflora of abalone haliotis discus hannai in culture changes coincident with a change in diet*. Fish. Sci., Cilt 69, 951-958s.

Tarradellas J., Bitton G., Rossel D. , (1997) *Soil Ecotoxicology*, Boca Raton: CRC Lewis Publishers.

Tenover C.F. (2006) *Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria*. The American Journal of Medicine. 119: 3-10s.

Thomashow L. S., Weller D. M., Bonsall R. F., Pierson, L. S. (1990) *Production of the Antibiotic Phenazine-1-Carboxylic Acid by Fluorescent Pseudomonas Species in the Rhizosphere of Wheat*, Appl. Environ. Microbiol. 56: 908-912s.

Thomashow L. S. (1996) Biological Control of Plant Root Pathogens. Curr. Opin. Biotechnol 7: 343-347s.

Turgay Dindaroğlu, Tuğrul Yakupoğlu, Sinem Keleşoğlu, Ömer Bolat (2015) *Farklı konsantrasyonlarda humik madde içeren organik madde kaynaklarının toprakların bazı fiziksel özellikleri üzerine etkisi*, KSÜ Doğa Bil. Der., Kahramanmaraş.

T. Zotta, E. Parente ve A. Ricciardi (2009) *Viability staining and detection of metabolic activity of sourdough lactic acid bacteria under stress conditions*, World J. Microbiol Biotechnol, 25: 1119-1124s.

Ulusoy S. (1999) *Antibiyotikler. Solunum Sistemi Enfeksiyonları*, Torak dergisi, 125-163s.

Ulusoy S. (2007) *Yoğun Bakım Ünitelerinden İzole Edilen Pseudomonas aeruginosa Suşlarında N-Açıl Homoserin Lakton Üretiminin Araştırılması*, Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Isparta, 100s.

Ünal H., Rasheed M.A., (1972) *Ankara Topraklarında Enzim Aktiviteleri ve Bunların Önemli Toprak özellikleri ile ilişkileri. I Üreaz, Sakkaraz ve B-Glikozidaz Aktiviteleri*, Ankara Üniversitesi Ziraat Fakülte Yıllığı 21, Fasikül 3-4, 592-606s.

Van Hoek A., Mevius D., Guerra B., Mullany P., Roberts P.A., Aarts J.M.H. (2011) *Acquired antibiotic resistance: an overview. Frontiers in Antimicrobials, Resistance and Chemotherapy. 2: 203s.*

Vedat T.E., İlknur C., Uğur İ. (2012) *Türkiyede Leonardit*, SAÜ Fen Edebiyyat dergisi, İzmir, Buca.

Velittin Balcı, Nilufer Gedikli (2011) *Golf alanlarında kullanılan kimyasal ilaçların ve gübrelerin çevre ve uygulayıcılar üzerine etkileri- organik yaklaşımlar*, Spormetre Beden eğitimi ve Spor Bilimleri Dergisi, 9(4): 141-148s.

Vessey J. K. (2003) *Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers*. Plant Soil., 225:571-586s.

Voisard C., Keel C., Haas D., Defago G. (1989) *Cyanide Production by Pseudomonas fluorescens Helps Suppress Black Root Rot of tobacco under gnotobiotic conditions*, EMBO Journal, 8: 351-358s.

Walsh U. F., Morrissey J. P., O'gara F. (2001) *Pseudomonas for Biological Control of Phytopathogens; from Functional Genomics to Commercial Exploitation*. Current opinion in Biotechnology 12: 289-295s.

Weller D. M. (1988) *Biological Control of Soilborne Plant Pathogens in the Rhizosphere with Bacteria*, Annu Rev Phytopathol, 26: 379-407s.

Whipps J. M. (2001) *Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere*. J. Exp.Bot. 52: 487-511s.

Wipat A., Harwood C.R. (1999) *The Bacillus subtilis Genome Sequence: The Molecular Blueprint of a Soil Bacterium*, FEMS Microbiology Ecology, 28: 1-9s.

Yazıcıoğlu D., (2010) *Toprak Örneklerinden İzole Edilen Endospor Oluşturan Basillerin Ağır Metal ve Antibiyotik Direnç Düzeylerinin Belirlenmesi*, Yüksek Lisans Tezi, Dumlupınar Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kütahya, 5-66s.

Yeşiltaş Y., (2014), *Arkeolojik Kazı Toprağından İzole Edilen, Endospor Oluşturan Basillerin Bazı Özelliklerinin İncelenmesi*, Yüksek Lisans Tezi, Dumlupınar Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kütahya, 33-69s.

Yu G.Y., Sinclair J.B., Hartman G.L., Bertagnolli B.L. (2002) *Production of iturin A by Bacillus amyloliquefaciens suppressing Rhizoctonia solani*. Soil Biol. Biochem. 34: 955-963s.

Zeynep Karakaş (2013) *Çevresel kaynaklardan izole edilen Pseudomonas AERUGINOSA'nın bazı virülans özelliklerinin ve antibiyotiklere karşı direncinin araştırılması*, Yüksek lisans tezi, AHİ Evran Üniversitesi, Kırşehir, 64s.

Z. Demirbağ, İ. Demir (2005), *Genel Mikrobiyoloji Laboratuvarı Uygulama Kitabı*, KATÜ, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Esen Maatbacılık, Trabzon, 126s.

ÖZGEÇMİŞ

Ad Soyad : S***** S*****
Uyruk : A*****n
Doğum yeri ve tarihi : S*****t, 0*/0*/1***
Medeni Hali : Bekar
Telefon: 0 5** 2** ** **
E-posta : s*****t@*****l.com
Lisans: Bakü Devlet Üniversitesi, Toprak Bilimi ve
Tarım Kimyası