

**ÇEVREDEKİ ORGANİK KİRLETİCİLERDEN BİYOTEKNOLOJİK  
OLARAK BAZI İKİNCİL METABOLİTLERİN ÜRETİMİ**

**Dilşad ONBAŞILI**

**DOKTORA TEZİ  
BİYOLOJİ**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**EKİM 2006  
ANKARA**

Dilşad ONBAŞILI tarafından hazırlanan ÇEVREDEKİ ORGANİK KİRLETİCİLERDEN BİYOTEKNOLOJİK OLARAK BAZI İKİNCİL METABOLİTLERİN ÜRETİMİ adlı bu tezin Doktora tezi olarak uygun olduğunu onaylarım.

Prof. Dr. Belma ASLIM

Tez Yöneticisi

Bu çalışma, jürimiz tarafından oybirliği ile Biyoloji Anabilim Dalında Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan : Prof.Dr. Emir CANSUNAR

Üye : Prof. Dr. Belma ASLIM (Danışman)

Üye : Prof. Dr. Yavuz BEYATLI

Üye : Prof. Dr. Gönül DÖNMEZ

Üye : Doç. Dr. Yusuf KALENDER

Tarih :17/10/2006

Bu tez, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kurallarına uygundur

## **TEZ BİLDİRİMİ**

Tez içindeki bütün bildirilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, ayrıca tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada orijinal olmayan her türlü kaynağa eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

Dilşad ONBAŞILI

**ÇEVREDEKİ BAZI ORGANİK KİRLETİCİLERDEN BİYOTEKNOLOJİK  
OLARAK BAZI İKİNCİL METABOLİTLERİN ÜRETİMİ**

**(Doktora Tezi)**

**Dilşad ONBAŞILI**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**Ekim 2006**

**ÖZET**

Araştırmada, 20 adet *Pseudomonas* cinsine ait bakteri suşları kullanılmıştır. Suşların oluşturduğu pigment, ekzopolisakkarit (EPS) ve ramnolipid üretimleri spektrofotometrik olarak belirlenmiş ve pigment üretimlerinin 2,11-10,10 µg/mL, EPS üretimlerinin 22-75 mg/L ve ramnolipid üretimlerinin ise 219-521 mg/L arasında değiştiği bulunmuştur.

Çevresel kirliliğe neden olan bazı organik kirleticilerin (2,4-D, benzin, BTX ve benzen) *Pseudomonas* spp. suşları üzerinde toksik etkileri araştırılmıştır. Bu amaçla suşlar üzerinde farklı konsantrasyonlardaki 2,4-D, benzin BTX ve benzen denenerek minimum inhibisyon konsantrasyonları (MİK) tespit edilmiştir. MİK' e göre suşların 2,4-D herbisiti ve benzene, BTX ve benzene oranla daha dirençli olduğu belirlenmiş ve bundan sonraki degradasyon çalışmaları MİK konsantrasyonları esas alınarak yürütülmüştür.

Çalışmada *Pseudomonas* spp. suşlarının çeşitli organik kirleticileri (2,4-D, benzin BTX ve benzen) farklı sürelerde (24, 48, 72 ve 96. saatlerde) biyodegradasyon yetenekleri ve bu esnada oluşturdukları ikincil metabolit üretimleri spektrofotometrik olarak belirlenmiştir. Suşlar arasından 2,4-D herbisiti, benzin, BTX ve benzeni karbon kaynağı olarak kullanıp bu organik kirleticilerde yüksek üretim gösteren suşlar sırasıyla 72. saatte *P. aeruginosa* B1,

96. saatte *P. putida* B15, 48. saatte *P. stutzeri* B11 ve 72. saatte *P. fluorescens* B5 olarak tespit edilmiştir. 2,4-D herbisitinde en yüksek piyosiyenin, EPS ve ramnolipid üretimi 72. saatte (sırasıyla 4,1 µg/mL, 40 mg/L, 45 mg/L) *P. aeruginosa* B1 suşu tarafından gerçekleşmiştir. Benzinde en yüksek ramnolipid üretimi 72. saatte (52 mg/L) *P. putida* B15 suşu tarafından elde edilmiştir. BTX' de en yüksek EPS üretimi 48. saatte (30 mg/L) *P. stutzeri* B11 suşu tarafından elde edilmiştir. Benzende en yüksek EPS üretimi 72. saatte (33 mg/L) *P. fluorescens* B5 suşu tarafından elde edilmiştir.

Araştırmada, en iyi sonuç veren *P. aeruginosa* B1 suşunun 2,4-D herbisitini farklı sürelerde (24, 48, 72 ve 96. saatlerde) degradasyonu ve bu esnada suşun en yüksek metabolit üretimi gösterdiği saatteki EPS' nin monomer yapısı High Performance Liquid Chromatography (HPLC) analizi ile yapılmış ve 2,4-D herbisitinin 24. saatte % 24' sının, 48. saatte % 31' unun, 72. saatte % 32' inin, ve 96. saatte ise % 33' sinin degrede olduğu en yüksek degradasyonun 24. saatte gerçekleştiği belirlenmiştir. *P. aeruginosa* B1 suşunun nutrient broth (NB) ve 2,4-D+MSM besiortamında ürettikleri EPS' nin monomer kompozisyonlarının farklı olduğu ve bu suşun NB besiortamında ki şeker kompozisyonunun % 31 glikoz, % 69 gliserol, 2,4-D+MSM besiortamında ise % 70 gliserol, % 30 N-asetil-D-glikoz amin, içerdiği tespit edilmiştir. Bununla birlikte, benzin, BTX ve benzen gibi petrol hidrokarbonlarında yüksek gelişim gösteren ve yüksek EPS üreten suşların da (benzinde *P. putida* B15, BTX' de *P. stutzeri* B11 ve benzende *P. fluorescens* B5) NB ve Petrol hidrokarbonu+MSM besiortamlarında ürettikleri EPS' nin monomer yapıları incelenmiş ve suşların ürettikleri EPS' nin başlıca bileşenlerinin glikoz, arabinoz, gliserol, riboz, galaktronik asit N-asetil-D-galaktoz amin ve N-asetil-D-glikoz amin olduğu bulunmuştur.

**Bilim Kodu** :216  
**Anahtar Kelimeler** :*Pseudomonas* spp., Piyosiyenin üretimi Ekzopolisakkarit üretimi (EPS), ramnolipid üretimi, organik kirleticiler, biyodegradasyon.  
**Sayfa Adedi** :125  
**Tez Yöneticisi:** : Prof. Dr. Belma ASLIM

**PRODUCTION OF SOME SECONDARY METABOLITES BY  
BIOTECHNOLOGICALLY FROM THE ORGANIC POLLUTANTS IN  
ENVIRONMENT**

**(Ph. D. Thesis)**

**Dilşad ONBAŞILI**

**GAZI UNIVERSITY  
INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY**

**October 2006**

**ABSTRACT**

**In this study, a total of twenty strains belonging to genera *Pseudomonas* were used. The productions of pigment (pyocyanin), exopolysaccharides (EPS) and rhamnolipid, formed by strains, were determined by spectrophotometric method. The production of pyocyanin ranged between 2.11-10.10 µg/mL, EPS 22-75 mg/mL and rhamnolipid 219-521 mg/mL.**

**Toxic effects of some organic environmental pollutants (2,4-D, gasoline, BTX and benzene) on strains of *Pseudomonas* spp. were investigated. For this purpose, various concentrations of 2, 4-D herbicide, gasoline, BTX and benzene were tested to determine the minimum inhibitory concentrations (MIC) of individual strains. Degradation studies were evaluated according to MICs and it was found that, strains were more resistant to 2, 4-D herbicide and benzene rather than BTX and gasoline.**

**In the present study, organic pollutant (2,4-D, gasoline, BTX and benzene) biodegradation abilities and secondary metabolite production rates of *P. aeruginosa* B1, *P. putida* B15, *P. stutzeri* B11 and *P. fluorescens* B5 for various**

periods of time (24, 48, 72 and 96 hrs) were determined by spectrophotometric method. In the presence of 2-4-D herbicide, maximal production of pyocyanin, EPS and rhamnolipid production was observed in *P. aeruginosa* B1 at 72 hours (4,1 µg/mL, 40 mg/L and 45 mg/L, respectively). In the presence gasoline, maximal production of rhamnolipid (52 mg/L) production was observed in *P. putida* B15 at 72 hours. In the presence BTX, maximal production of EPS production (30 mg/L) was observed in *P. putida* B11 at 48 hours and in benzene, maximal production of EPS production (33 mg/L) was observed in *P. fluorescens* B5 at 72 hours.

The monomer compositions and EPS production of *P. aeruginosa* B1, which degraded to 2, 4-D at different growth time (24, 48, 72 and 96 hrs), were determined by using HPLC. The degradation of 2, 4-D herbicide advanced to 24 % at 24 hrs, 31 % at 48 hrs, 32 % 72 hrs and 33 % at 96 hrs. The monomeric composition of EPS produced by *P. aeruginosa* B1 were found some differences between nutrient broth and MSM medium with 2, 4-D. Sugar composition of EPS produced by *P. aeruginosa* B1 in NB was 31 % glucose, 69 % glycerol and 70 % glycerol, 30 % N-acetyl-D-glucose amine in MSM medium with 2,4-D. On the other hand, the monomeric EPS constituents of strains that grow well in petroleum hydrocarbons, such as gasoline, BTX and benzene (*P. putida* B15 in benzene, *P. stutzeri* B11 in BTX and *P. fluorescence* B5 in benzene) were determined as glucose, arabinose, glycerol ribose, galactronic acid, N-acetyl-D-galactose amine and N-acetyl-D-glucose amine when grown in nutrient broth and MSM medium with petroleum hydrocarbon.

Science Code:	:216
Key Words	: <i>Pseudomonas</i> spp., pyocyanin production, EPS production, rhamnolipid production, organic pollutants, biodegradation
Page Number	:125
Adviser:	:Prof. Dr. Belma ASLIM

## TEŞEKKÜR

Tez çalıŐmalarım boyunca değerli ilgi ve yardımlarını esirgemeyen, tecrube ve eŐsiz bilgilerinden yararlandığım sayın hocam Prof. Dr. Belma ASLIM' a sonsuz teşekkür ederim.

Tez İzleme Komitesi toplantıları sırasında kıymetli bilgi ve desteklerinden faydalandığım sayın hocalarım Prof. Dr. Yavuz BEYATLI' ya, Prof. Dr. Gönül DÖNMEZ' e,

ÇalıŐmalarım ve tez yazım aşamalarında dostluk ve desteğini esirgemeyen değerli arkadaşım AraŐ. Gör. Dr. Zehra Nur YÜKSEKDAĞ' a, AraŐ. Gör. Őahlan ÖZTÜRK ve diğer çalışma arkadaşlarıma,

Maddi ve manevi destekleri ve ilgileriyle hayatım boyunca yanımda olan sevgili aileme teŐekkürlerimi sunarım.



**İÇİNDEKİLER**

	<b>Sayfa</b>
ÖZET.....	iv
ABSTRACT.....	v
TEŞEKKÜR.....	viii
İÇİNDEKİLER.....	ix
ÇİZELGELERİN LİSTESİ.....	xiii
ŞEKİLLERİN LİSTESİ.....	xv
RESİMLERİN LİSTESİ.....	xviii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xix
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI.....	4
2.1. <i>Pseudomonas</i> Cinsi Bakterilerin Genel Özellikleri.....	4
2.1.1. <i>Pseudomonas</i> spp. suşlarının pigmentleri.....	5
2.1.2. <i>Pseudomonas</i> spp. suşlarında ekzopolisakkarit (EPS) üretimi.....	8
2.1.3. <i>Pseudomonas</i> spp. suşlarında ramnolipid üretimi.....	10
2.2. Mikrobiyal Metabolitler.....	13
2.2.1. <i>Pseudomonas</i> cinsi bakterilerin sekonder metabolitleri .....	14
2.3. Organik Bileşiklerin Biyolojik Olarak Parçalanması .....	16
2.3.1. Organik bileşiklerin aerobik parçalanması .....	17
2.3.2. Organik bileşiklerin anaerobik parçalanması.....	17
2.3.3. Organik bileşiklerin fermentasyon yolu ile parçalanması .....	18
2.4. Biyolojik Olarak Parçalanabilen Aromatik Hidrokarbonlar .....	18
2.5. Biyolojik Olarak Parçalanabilen Herbisitler .....	22

**Sayfa**

2.6. Biyolojik Temizleme (Biyoremediasyon).....	25
3. MATERYAL VE METOT.....	26
3.1. Materyal.....	26
3.1.1. Materyal örnekleri.....	26
3.1.2. Araştırmada kullanılan bakterilerin aktifleştirilmesi ve gelişim koşulları.....	26
3.2. Metot.....	27
3.2.1. Bakterilerin muhafazası .....	27
3.2.2. Mac Farland metoduna göre bakterilerin hücre yoğunluğunun belirlenmesi.....	27
3.2.3. <i>Pseudomonas</i> spp. suşlarında pigment (piyosiyanın) üretiminin tespiti .....	28
3.2.4. <i>Pseudomonas</i> spp. suşlarında ekzopolisakkarit (EPS) üretiminin tespiti.....	31
3.2.5. <i>Pseudomonas</i> spp. suşlarında ramnolipid biyosürefektan üretiminin tespiti.....	32
3.2.6. İstatiksel analiz.....	32
3.2.7. Organik bileşiklerin (2,4-D, Benzin, BTX, Benzen) <i>Pseudomonas</i> spp. suşları üzerine Minimum İnhibitör Konsantrasyonunun (MİK) belirlenmesi.....	33
3.2.8. <i>Pseudomonas</i> spp. suşlarının bazı organik kirleticileri biyodegradasyonu.....	33
3.2.9. <i>Pseudomonas</i> spp. suşlarının organik kirleticileri biyodegradasyonu esnasında elde edilen EPS, piyosiyanın ve ramnolipid üretimlerinin tespiti.....	35
3.2.10. Minimal besiortamında organik kirleticilerin biyodegradasyonunun High-Performance Liquid Kromatografisi (HPLC) analizi ile belirlenmesi.....	35

3.2.11. Minimal besiortamında organik kirleticilerin biyodegradasyonunda <i>Pseudomonas</i> spp. suşlarının ürettikleri EPS' nin monomer yapısının High-Performance Liquid Kromatografisi (HPLC) analizi ile belirlenmesi.....	36
4. DENEYSEL BULGULAR.....	38
4.1. <i>Pseudomonas</i> Cinsine Ait Türlerde Pigmentasyon .....	38
4.1.1. Farklı besiortamlarında geliştirilen <i>Pseudomonas</i> spp. suşlarının pigmentasyonu.....	38
4.1.2. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> suşlarında piyosiyanın pigmenti üretim miktarları.....	41
4.2. <i>Pseudomonas</i> spp. Suşlarında EPS Üretim Miktarları .....	42
4.3. <i>Pseudomonas</i> spp. Suşlarında Ramnolipid Üretim Miktarı .....	44
4.4. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Suşlarının Piyosiyanın Üretimi ve Ramnolipid Üretimi Arasındaki İlişkinin İstatistiksel Olarak Belirlenmesi....	46
4.5. 2,4-D, Benzin, BTX ve Benzen' in <i>Pseudomonas</i> spp. Suşlarına Minimum İnhibitör Konsantrasyonunun (MİK) Belirlenmesi.....	46
4.6. Minimal Besiortamında <i>Pseudomonas</i> spp. Suşlarının Organik Kirleticileri Biyodegradasyonu.....	49
4.7. Minimal Besiortamında <i>Pseudomonas</i> spp. Suşlarının Organik Kirleticilerde Piyosiyanın Üretimlerinin Belirlenmesi.....	53
4.8. Minimal Besiortamında <i>Pseudomonas</i> spp. Suşlarının Organik Kirleticileri Biyodegradasyonu Esnasında Ekzopolisakkarit (EPS) Üretimlerinin Belirlenmesi.....	57
4.9. <i>Pseudomonas</i> spp. Suşlarının Bakteriyal Gelişimi ve EPS Üretimi Arasındaki İlişkinin İstatistiksel Olarak Belirlenmesi.....	63
4.10. Minimal Besiortamında <i>Pseudomonas</i> spp. Suşlarının Organik Kirleticileri Biyodegradasyonu Esnasında Ramnolipid Üretimlerinin Belirlenmesi.....	64
4.11. Minimal Besiortamında <i>Pseudomonas aeruginosa</i> B1 Suşunun 2,4-D Herbisitini Biyodegradasyonunun High-Performance Liquid Kromatografisi (HPLC) Analizi ile Belirlenmesi.....	69

**Sayfa**

4.12. Minimal Besiortamında <i>Pseudomonas aeruginosa</i> B1 Suşunun 2,4-D Herbisitini Biyodegradasyonu Esnasında Üretilen EPS' nin Monomer Yapısının High-Performance Liquid Kromatografisi (HPLC) Analizi ile Belirlenmesi.....	74
5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	91
KAYNAKLAR.....	109
ÖZGEÇMİŞ.....	124

## ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 2.1. 2,4-D' nin fiziksel ve kimyasal özellikleri .....	23
Çizelge 3.1. Mac Farland metoduna göre A ve B çözeltilerinin karışım oranları ....	28
Çizelge 4.1. Farklı besiortamlarında geliştirilen <i>Pseudomonas</i> spp. suşlarının pigment oluşumları .....	40
Çizelge 4.2. <i>P. aeruginosa</i> suşlarının piyosiyanın üretimleri .....	41
Çizelge 4.3. Bazı <i>Pseudomonas</i> spp. suşlarının EPS üretimleri .....	43
Çizelge 4.4. Bazı <i>Pseudomonas</i> spp. suşlarının ramnolipid üretimleri .....	45
Çizelge 4.5. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> suşlarının piyosiyanın üretimi ve ramnolipid üretimi arasındaki ilişki.....	46
Çizelge 4.6. Farklı konsantrasyonlardaki 2,4-D, benzin, BTX ve benzenin <i>Pseudomonas</i> spp. suşlarına olan minimum inhibisyon konsantrasyon (MİK) değerleri.....	48
Çizelge 4.7. <i>Pseudomonas</i> spp. suşlarının 50 mg/mL 2,4-D ve % 1' lik benzende belli zaman aralıklarındaki (24, 48, 72 ve 96. saatlerdeki) bakteri gelişimi.....	51
Çizelge 4.8. <i>Pseudomonas</i> spp. suşlarının %1' lik BTX ve % 2'lik benzinde belli zaman aralıklarındaki (24, 48, 72 ve 96. saatlerdeki) bakteri gelişimi.....	52
Çizelge 4.9. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> suşlarının 50 mg/mL 2,4-D ve % 1' lik benzende belli zaman aralıklarındaki (24, 48, 72 ve 96. saatlerdeki) biyodegradasyonu esnasında piyosiyanın üretimleri (µg/mL).....	55
Çizelge 4.10. <i>Pseudomonas</i> spp. suşlarının % 1' lik BTX ve % 2' lik benzinde belli zaman aralıklarındaki (24, 48, 72 ve 96. saatlerdeki) biyodegradasyonu esnasında piyosiyanın üretimleri (µg/mL).....	56

<b>Çizelge</b>	<b>Sayfa</b>
Çizelge 4.11. <i>Pseudomonas</i> spp. suşlarının 50 mg/mL 2,4-D ve % 1' lik benzende belli zaman aralıklarındaki (24, 48, 72 ve 96. saatlerdeki) EPS üretimi (mg/L).....	59
Çizelge 4.12. <i>Pseudomonas</i> spp. suşlarının 50 mg/mL 2,4-D, % 1' lik benzende, % 1' lik BTX ve % 2' lik benzinde belli zaman aralıklarındaki (24, 48, 72 ve 96. saatlerdeki) EPS üretimi (mg/L).....	60
Çizelge 4.13. <i>Pseudomonas</i> spp. suşlarının çeşitli organik kirleticilerin farklı sürelerde bakteriyal gelişim ve EPS üretimi arasındaki $\rho$ değeri ve anlamlılık düzeyleri.....	64
Çizelge 4.14. <i>Pseudomonas</i> spp. suşlarının 50 mg/mL 2,4-D, % 1' lik benzende, % 1' lik BTX ve % 2' lik benzinde belli zaman aralıklarındaki (72 ve 96. saatlerdeki) ramnolipid üretimi (mg/L).....	67
Çizelge 4.15. <i>P. aeruginosa</i> B1 suşunun 50 mg/L' lik 2,4-D herbisitini belli zaman aralıklarında ki (24, 48, 72 ve 96. saat) degradasyon oranı.....	69
Çizelge 4.16. Farklı organik kirleticilerde (2,4-D, BTX ve benzen) gelişim gösteren yüksek EPS üreten suşların bu ortamda ürettikleri EPS' nin karbohidrat kompozisyonu.....	75

## ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. Ramnolipid biyosürefektananın kimyasal yapısı .....	11
Şekil 2.2. Katekole benzenin oksidasyonu .....	19
Şekil 2.3. Katekol katabolizması için <i>Meta</i> - kırılma metabolik yolu .....	19
Şekil 2.4. Katekolün katabolizması için <i>Orto</i> - kırılma metabolik yolu .....	20
Şekil 4.1. Farklı sürelerde (24, 48, 72 ve 96. saat) 2,4-D herbisitini karbon kaynağı olarak kullanan <i>P. aeruginosa</i> B1 suşunun bakteriyal gelişimi ve piyosiyanın pigmenti üretimi.....	54
Şekil 4.2. Farklı sürelerde (24, 48, 72 ve 96. saat) 2,4-D herbisitini karbon kaynağı olarak kullanan <i>P. aeruginosa</i> B1 suşunun bakteriyal gelişimi ve EPS üretimi.....	61
Şekil 4.3. Farklı sürelerde (24, 48, 72 ve 96. saat) benzini karbon kaynağı olarak kullanan <i>P. putida</i> B15 suşunun bakteriyal gelişimi ve EPS üretimi.....	61
Şekil 4.4. Farklı sürelerde (24, 48, 72 ve 96. saat) BTX' i karbon kaynağı olarak kullanan <i>P. stutzeri</i> B11 suşunun bakteriyal gelişimi ve EPS üretimi.....	62
Şekil 4.5. Farklı sürelerde (24, 48, 72 ve 96. saat) benzeni karbon kaynağı olarak kullanan <i>P. fluorescens</i> B5 suşunun bakteriyal gelişimi ve EPS üretimi.....	62
Şekil 4.6. Farklı sürelerde (24, 48, 72 ve 96. saat) 50 mg/mL 2,4-D herbisitini karbon kaynağı olarak kullanan <i>P. aeruginosa</i> B1 suşunun bakteriyal gelişimi ve ramnolipid üretimi.....	68
Şekil 4.7. Farklı sürelerde (24, 48, 72 ve 96. saat) % 2' lik benzini karbon kaynağı olarak kullanan <i>P. putida</i> B15 suşunun bakteriyal gelişimi ve ramnolipid üretimi.....	68

<b>Şekil</b>	<b>Sayfa</b>
Şekil 4.8. <i>P. aeruginosa</i> B1 suşunun 24. saatte 50 mg/L' lik 2,4-D herbisitinin degradasyon kromotogramı (Siyah pik: Kontrol MSM+2,4-D, Pembe pik: MSM+ <i>P. aeruginosa</i> B1+ 2,4-D).....	70
Şekil 4.9. <i>P. aeruginosa</i> B1 suşunun 48. saatte 50 mg/L' lik 2,4-D herbisitinin degradasyon kromotogramı (Siyah pik: Kontrol MSM+2,4-D, Pembe pik: MSM+ <i>P. aeruginosa</i> B1+ 2,4-D).....	71
Şekil 4.10. <i>P. aeruginosa</i> B1 suşunun 72. saatte 50 mg/L' lik 2,4-D herbisitinin degradasyon kromotogramı (Siyah pik: Kontrol MSM+2,4-D, Pembe pik: MSM+ <i>P. aeruginosa</i> B1+ 2,4-D) .....	72
Şekil 4.11. <i>P. aeruginosa</i> B1 suşunun 96. saatte 50 mg/L' lik 2,4-D herbisitinin degradasyon kromotogramı (Siyah pik: Kontrol MSM+2,4-D, Pembe pik: MSM+ <i>P. aeruginosa</i> B1+ 2,4-D).....	73
Şekil 4.12. <i>P. aeruginosa</i> B1 suşunun NB besiortamında ürettiği EPS' nin şeker analiz kromotogramı.....	76
Şekil 4.13. <i>P. aeruginosa</i> B1 suşunun 2,4-D+MSM besiortamında ürettiği EPS' nin şeker analiz kromotogramı.....	77
Şekil 4.14. <i>P. fluorescens</i> B5 suşunun NB besiortamında ürettiği EPS' nin şeker analiz kromotogramı .....	78
Şekil 4.15. <i>P. fluorescens</i> B5 suşunun NB besiortamında ürettiği EPS' nin asit analiz kromotogramı.....	79
Şekil 4.16. <i>P. fluorescens</i> B5 suşunun benzen+MSM besiortamında ürettiği EPS' nin şeker analiz kromotogramı.....	80
Şekil 4.17. <i>P. fluorescens</i> B5 suşunun benzen+MSM besiortamında ürettiği EPS' nin asit analiz kromotogramı.....	81
Şekil 4.18. <i>P. stutzeri</i> B11 suşunun NB besiortamında ürettiği EPS' nin şeker analiz kromotogramı.....	82
Şekil 4.19. <i>P. stutzeri</i> B11 suşunun NB besiortamında ürettiği EPS' nin asit analiz kromotogramı.....	83



<b>Şekil</b>	<b>Sayfa</b>
Şekil 4.20. <i>P. stutzeri</i> B11 suşunun BTX+MSM besiortamında ürettiği EPS' nin şeker analiz kromotogramı.....	84
Şekil 4.21. <i>P. stutzeri</i> B11 suşunun BTX+MSM besiortamında ürettiği EPS' nin asit analiz kromotogramı.....	85
Şekil 4.22. <i>P. putida</i> B15 suşunun NB besiortamında ürettiği EPS' nin şeker analiz kromotogramı.....	86
Şekil 4.23. <i>P. putida</i> B15 suşunun NB besiortamında ürettiği EPS' nin asit analiz kromotogramı.....	87
Şekil 4.24. <i>P. putida</i> B15 suşunun benzin+MSM besiortamında ürettiği EPS' nin şeker analiz kromotogramı.....	88
Şekil 4.25. <i>P. putida</i> B15 suşunun benzin+MSM besiortamında ürettiği EPS' nin asit analiz kromotogramı.....	89
Şekil 4.26. <i>P. putida</i> B15 suşunun benzin+MSM besiortamında ürettiği EPS' nin asit analiz kromotogramı.....	90

**RESİMLERİN LİSTESİ**

<b>Resim</b>	<b>Sayfa</b>
Resim 4.1. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> B20 (+++) suşunun Pseudomonas Agar Base CN supplement besiyetinde ki pigmentasyonu.....	39
Resim 4.2. <i>Pseudomonas stutzeri</i> B8 (-) suşunun Pseudomonas Agar Base CN supplement besiyetinde ki pigmentasyonu.....	39
Resim 4.3. <i>P. aeruginosa</i> B20 suşunun oluşturduğu piyosiyenin pigmentinin (a) kloroformda mavi renkte ki bazik eriği ve (b) üzerine asit konulunca oluşan kırmızı renkli tuz hali görünümü.....	42

## SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış bazı simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

<b>Simgeler</b>	<b>Açıklama</b>
$\alpha$	Alfa
$\beta$	Beta
$\rho$	Ro
°C	Santigrat derece
bp	Baz çifti
cm	Santimetre
Da	Dalton
et al	Ve arkadaşları
g	Gram
L	Litre
mL	Mililitre
mg	Miligram
N	Normalite
nm	Nanometre
$\mu$ g	Mikrogram
$\mu$ L	Mikrolitre
rpm	Devir sayısı
v/v	Hacim/Hacim
vd	Ve diğerleri
%	Yüzde

**Simgeler****dk****Açıklama**

Dakika

**dev.**

Devir

**Kısaltmalar****Açıklama****2,4-D**

2,4-Diklorofenoksiasetik asit

**API**

Analitik Profile Indeks

**BTX**

Benzen, Toluen, Ksilen

**DNA**

Deoksiribo Nükleik Asit

**EPA**

Environmental Pollution Agency

**EPS**

Ekzopolisakkarit

**HPLC**High Performance Liquid  
Chromotography**MİK**

Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu

**MSM**

Minimal Salt Media

**NB**

Nutrient Broth

**OD**

Optikal Dansite

**ODTÜ**

Orta Doğu Teknik Üniversitesi

**TCA**

Triklörürasetik asit

**UV**

Ultraviyole

## 1. GİRİŞ

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

Hızla gelişmekte olan ülkemizde enerji kaynağı olarak petrolün tüketimindeki artış, petrol ürünlerinin üretimi, işlenmesi esnasında oluşan atıklar, taşınması esnasında oluşan kazalar ve sızıntılar nedeni ile hidrokarbonlarla kirletilmiş alanların miktarı da artmaktadır. Aynı zamanda zirai mücadelede rol alan kimyasal maddelerden olan pestisitler, özellikle de herbisitler, endüstride ve tarım alanlarındaki kullanımları sonucu çevreye yayılmakta, toprakta ve suda uzun süre bozulmadan kalarak birikmektedirler. Dünyada olduğu gibi ülkemizde de kullanılan bu organik bileşiklerin özellikle petrol ürünleri ve kimyasallar' ın (plastikler, ilaç maddeleri, deterjanlar, böcek ve bitki ilaçları) canlılar için toksik ve kanserojen olduğu bilinmektedir.

Son yıllarda küresel endüstrileşme ve teknolojiye bağlı olarak ortaya çıkan atık maddelerin çevreye olan olumsuz etkilerini gidermek veya azaltmak için atık maddelerin giderimi ya da değerlendirilmesinde kullanılan klasik endüstriyel yöntemler yerine biyoteknolojik yöntemler tercih edilmektedir. Bu uygulamalarda atık maddelerin geri kazanımı çevre dostu teknolojilerin temel hedefi durumuna gelmiştir. Böylece hem endüstriyel atık maddelerin biyoteknolojik yöntemle geri kazanılarak tekrar ham madde olarak kullanılması gerçekleştirilecek, hem de tarım, kozmetik, sağlık, petrol endüstrisi ve çevre teknolojisi gibi alanlarda ekonomik olarak değerlendirilmesi sağlanmış olacaktır [1].

Son zamanlarda biyoteknoloji alanındaki araştırmalar mikroorganizmalar yardımı ile atık maddelerin parçalaması ve yeni ürünlerin elde edilmesi esasına dayanmaktadır. Böylece hem çevre kirliliği azaltılacak hem de insanların yaşamı için yararlı ürünlerin elde edilmesi sağlanmış olacaktır. Söz konusu atık maddelerin ham madde olarak kullanımı sonucu mikrobiyal yolla elde edilen biyoteknolojik ürünlerden birkaçı mikrobiyal polisakkaritler, pigmentler ve de biyosürefektanlar (biyo-yüzey aktif maddeler)' dir [1, 2, 3]. Doğada birçok mikroorganizma, özellikle de *Pseudomonas* cinsi üyeleri, üreme ve çoğalmak için farklı karbon kaynakları kullanarak ikincil metabolitler (ekzopolisakkarit, piyosiyenin ve ramnolipid) sentezlemektedirler [3-9].

Toprakta yaygın olarak bulunan *Pseudomonas* cinsi bakterilerin, özellikle çevre kirliliği bakımından ciddi risk oluşturan kirletici faktörleri önemli oranda degradasyon kabiliyeti göstererek toprağın doğal yolla temizlenmesinde rol oynaması sebebiyle çevre biyoteknolojisine yönelik çalışmalarda tercih edilmektedir. Ancak bu özelliğinin yanı sıra bu bakteriler tarafından bir çok alanda önemli olan biyoteknolojik metabolitlerin üretiminde biyoteknoloji alanındaki araştırmalara yeni bir boyut getireceği düşünölmektedir. Bu amaçla çalışmada, atık su ve toprak örneklerinden izole edilmiş olan *Pseudomonas* spp. suşları kullanılarak bu suşların çeşitli çevrelerde diğer mikroorganizmalara oranla canlı kalabilme şansını artıran ve onları üstün kılan bazı metabolitleri (piyosiyenin, ekzopolisakkarit ve ramnolipid) üretim yetenekleri araştırılmıştır. Suşlar üzerine önemli ölçüde çevre kirliliğine yol açan organik bileşiklerin [2,4-D (2,4-Dichlorophenoxyacetic acid), benzin, BTX (benzen, toluen, ksilen) ve benzen] toksik etkileri araştırılarak bu bileşiklere suşların dirençliliklerinin teşpiti hedeflenmiştir. Ayrıca *Pseudomonas* spp. suşlarının farklı inkübasyon sürelerinde bazı organik bileşikleri (2,4-D, benzin, BTX ve benzen) hücre gelişimlerine bağlı olarak biyodegradasyon kapasiteleri ve EPS, piyosiyenin ve ramnolipid üretim yetenekleri spektrofotometrik olarak incelenmiştir. Araştırmada biyodegradasyon yeteneği yüksek olan ve yüksek oranda EPS, piyosiyenin ve ramnolipid üretme kapasitesine sahip *Pseudomonas* spp. suşların seçimi amaçlanmıştır. Seçilen bu suşların, bazı organik kirleticileri degrade etme yetenekleri

ve bu esnada ürettikleri EPS' lerin monomer yapılarının HPLC (High Performance Liquid Cromotography ) analizi ile tespiti hedeflenmiştir.

## 2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

### 2.1. *Pseudomonas* Cinsi Bakterilerin Genel Özellikleri

*Pseudomonas* cinsi, *Pseudomonadaceae* ailesine ait olup, düz veya hafif kıvrık çubuk şeklindedir. Uzunlukları 1,5-5,0 µm, genişlikleri 0,5-1,0 µm arasındadır. Hareket, bir veya birkaç polar flagella ile sağlanır, bazı türleri farklı uzunlukta lateral flagellaya sahiptir, nadiren hareketsizdirler. Polar flagellaların sayısı önemli bir taksonomik karakterdir. Gram-negatif ve zorunlu aerobik bakterilerdir. Fakat bazı türleri nitratın varlığında anaerobik olarak gelişirler. Oksidaz pozitif veya negatif, katalaz pozitifler [10, 11, 12].

Pigmentasyon, *Pseudomonas* cinsinin genel bir karakteridir, ancak pigment oluşturmayan türlere de sahiptir. Bazı türleri ayırt edici koloni morfolojisi gösterirler [13].

Bazı türleri 4°C'de gelişebilir, ancak çoğu 30-37 °C arası optimal gelişim sıcaklığına sahip mezofilik bakterilerdir. Bir çok türü, asidik şartlarda (pH 4.5) gelişemezler [10].

Bir çok *Pseudomonas* türü amonyum tuzlarının ve tek bir karbon kaynağının bulunduğu ortamlarda gelişebilirler. Sadece birkaç tür organik gelişim faktörlerine ihtiyaç duyar. Kemoorganotrofikler, fakat bazı türleri ototrofik şartlar altında da gelişebilir. Hiç bir türü fermentatif ve fotosentetik değildir [11].

Çok güçlü metabolizmaları bulunan *Pseudomonas* cinsi bakterilerin çoğunun direkt izolasyonu yapılabilmektedir. Bunda doğada özellikle havada, toprakta ve sularda yaygın bulunmaları büyük rol oynar. Cins üyelerinin bir kısmı bitkiler, hayvanlar ve insanlar üzerinde patojenik özellikler gösterirler. Özellikle memeli hayvan ve insanların bağırsağında az sayıda bulunan *Pseudomonas aeruginosa* son zamanlarda fırsatçı bir patojen olarak kabul edilmektedir [14]. *P. aeruginosa*'nın patojenliği insanda çeşitli enfeksiyonlara neden olan virülens faktörlerinden kaynaklanmaktadır.



Bu virülens faktörlerden bazıları ekzotoksin A, fosfolipaz C, proteaz, pili, ekzopolisakkarit kapsül, pigmentler ve ramnolipidlerdir [15]. Bu virülens faktörlerden ekzopolisakkarit kapsül, pigmentler ve ramnolipidler *Pseudomonas*' lar tarafından üretilen sekonder metabolitler olarak adlandırılmaktadırlar [16, 17]. Bu metabolitler *Pseudomonas*' ların hayatta kalmalarını ve diğer bakterilerle rekabet etmelerini sağlamaktadır. Örneğin, suda çözünebilir bir sekonder metabolit olan piyosiyenin, çeşitli mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal aktivite göstermektedir [16].

*Pseudomonas* bakterileri genetik çalışmalarda özel bir ilgiye sahiptir. Bunun nedenleri, geniş bir yayılım alanına, medikal öneme, beslenme ve biyokimyasal çok yönlülüğe sahip olmaları ile laboratuvar ortamlarında geliştirilebilmeleri için gerekli şartların basit olmasıdır [14]. Genetik araştırmalar yönünden *P. aeruginosa* PAO1 suşu oldukça detaylı çalışılmıştır ve bu suşun genom dizisi belirlenmiştir. Bakterinin genom büyüklüğünün 6 264 403 bp olduğu belirlenmiştir [18].

Bir çok organik bileşik *Pseudomonas* türleri tarafından mineralize edilebilir. Bu bakteriler bu bileşikleri karbon ve enerji kaynağı olarak kullanırlar. Buna bağlı olarak *Pseudomonas* türleri, biyoremediasyonda kullanım potansiyeline sahiptir [19].

### **2.1.1. *Pseudomonas* spp. suşlarının pigmentleri**

Bakteriler kendi hücreleri içerisinde kalan veya buldukları ortama saldıkları bazı renkli maddeler yaparlar. Bir çok mikroorganizmanın özellikle *Streptomyces*, *Streptosporangium*, *Microbispora*, *Brevibacterium*, *Sorangium* ve *Pseudomonas* cinsi üyelerinin pigment üretimi bildirilmiştir [20]. *Pseudomonas* türlerinin piyoverdin (fluoressein), piyosiyenin, piyorubin ve piyomelanin adı verilen çeşitli pigmentler oluşturdukları ve bu pigmentlerin onlara seçici bir özellik kazandırdığı bildirilmiştir [21]. Son yıllarda ki bir çok çalışma fluoresens *Pseudomonas*' ların temsilcilerinden özellikle de besiyeri içerisinde mavi-yeşil piyosiyenin pigmentini üreten *P. aeruginosa* ile yürütülmektedir [22].

Mikroorganizmalar doğada fenazinin özel kaynaklarıdır. Çeşitli mikroorganizmalar tarafından üretilen 30 farklı fenazin bileşiği şimdiye kadar tanımlanmıştır. Fenazinin organik çözücülerle kültür filtratlarının ekstraksiyonuyla izole edilmişlerdir. *Pseudomonas* sp.'leri arasında fluoresens *Pseudomonas*'lara ait bir çok suşla ve *P. cepecia* grubunun bazı üyeleri tarafından fenazin üretilmektedir. Fenazin, *Pseudomonas* cinsi bakteriler tarafından üretilen antifungal antibiyotik benzeri maddelerdir. Bu yüzden çeşitli fenazin pigmentlerin üretimi ve biyosentetik yolları bilinmektedir [23].

Piyosiyanın, *P. aeruginosa* tarafından üretilen suda ve kloroformda eriyen, fluoresans vermeyen fenazin grubundan mavi-yeşil pigment özelliğinde olan kimyasal bir maddedir. Sıvı besiyerlerinden yapılmış bakteri kültürlerine eşit miktarda kloroform eklenir ve çalkalanırsa bu pigment besiyerinin içinde çökmüş halde bulunan kloroform içerisinde kristalize olarak koyu mavi renkte gözlenir [24]. Piyosiyanın çok çalışılmış bir fenazin pigmenttir. Fenazinin antibiyotik özelliklere sahip oldukları ve mikroorganizmanın gelişiminin durgun fazında oluştuğu için sekonder metabolit olarak sınıflandırılmaktadırlar. Bu pigment, *P. aeruginosa*'nın hem patojenitesi hem de fizyolojisini belirleyici bir faktör olarak kullanılmaktadır [25, 26]. Piyosiyanın, inorganik fosfatın bakteri hücrelerine alınmasına rol oynar [21].

Fluoresans pigmentler, fluoresans özellik taşıyan *Pseudomonas*'ların (*P. aeruginosa*, *P. putida*, *P. fluorescens*, *P. chlororaphis*, *P. syringae*, *P. cichori*, *P. flavescens*) karakteristiğidir. Bu pigmentler sideroforlardır. Sideroforlar, mikroorganizmalar tarafından üretilen metabolitlerdir. Bu bileşikler demiri bağlar ve kültür ortamında düşük demir konsantrasyonlarında bol miktarda üretilirler. Böylece ortamda bulunmayan demir problemini azaltır. Fluoresans *Pseudomonas*'lar tarafından üretilen sideroforlar (piyoverdin, salisilat ve piyoselin) diğer mikroorganizmaların inhibisyonuna neden olmaktadır [27]. Demir stresinde bir çok aerobik mikroorganizma, en az bir siderofor üretir [28]. Sideroforlar antimikrobiyal aktivitesi önemli olan ekolojik etkilere sahip yapılardır. Örneğin; fluoresans *Pseudomonas*'ların sideroforları, bitkilere patojen bazı *Pseudomonas* spp. ve fungusların çeşitli suşlarına karşı antagonizm'den sorumludur [29, 30]. Buna ilaveten mikrobiyal

sideroforlar, bitkiler için demir kaynağı rezervidir [31-33]. Flouressein, kloroformda çözünmeyen ancak suda çözünen sarımsı renkte bir fluoresens pigmentidir. Bu pigmentin görülebilmesi için bazen UV ışığa ihtiyaç duyulur [34].

Piyoverdin, fluoresens grupta yer alan *P. aeruginosa*, *P. flourescens* ve *P. putida* tarafından sentezlenen, suda eriyen, kloroformda erimeyen, ultraviyole ışığında fluoresens veren, sarı-yeşil renkte bir pigment grubunu ifade eder [22]. Piyoverdinler, kararlı olmayan bileşiklerdir. Son yıllarda Meyer [2] ve diğer bilim adamları tarafından yapılan çalışmalar neticesinde *P. flourescens*' e ait piyoverdin pigmenti hakkında geniş bilgiler elde edilmiştir. Piyoverdinler, 3 farklı yapısal bölümden oluşmaktadır; fluoresandan sorumlu quinoline türevi bir kromofor, dikarboksilik asit veya onun kromoforuna yani 5-aminogrubuna bağlı monoamit bağları ve 1-carboxylic gruba bağlı 6-12 aminoasitlik peptit zinciri [35]. Meyer ve Hornsperger (1978) piyoverdinin siderofor olarak  $Fe^{+3}$  ün aktif transportunda rol aldığını aydınlatmışlardır [36].

Piyosiyaninin türevi olan piyoselin, *P. aeruginosa*' ların sideroforlarından biridir. Biyogenetik olarak, salisilik asit ve sisteinin iki molekülünün kondensasyon ürünüdür. Piyoselinin yapısı şu şekildedir. 2-(2-*o*-hidroksifenil-2-thiazolin-4-yl) 3-metilthiazolidine-4-carboksilik asit. Bunlar, iki adet stereoisomer (piyoselin1-2) oluştururlar.

Piyorubin, bazı *P. aeruginosa* suşları tarafında üretilen parlak kırmızı renkte, kloroformda çözünmeyen ancak suda çözünen bir fenazin pigmentidir. Düşük oksijen konsantrasyonunda geri dönüşümsüz olarak rengini yitirir. Tüm pH derecelerinde kırmızı renktedir [21].

Piyomelanin, *P. aeruginosa* kökenlilerin % 2-3' ü tarafından oluşturulan ve başka hiçbir bakteri tarafından sentezlenmeyen, suda eriyen, kahverengimsi siyah renkte bir pigmenttir [21].

### 2.1.2. *Pseudomonas* spp. suşlarında ekzopolisakkarit (EPS) üretimi

EPS' ler suda çözünen, glikozid bağları ile birbirine bağlı şeker ünitelerinden oluşan polimerlerdir. Klinik ve çevresel ortamlardaki bakterilerin bir çoğunun özellikle de toprak, deniz, tatlı su gibi farklı çevresel örneklerden izole edilen, çok sayıda bakteriler, *Bacillus*' lar, *Pseudomonas*' lar, *Lactobacillus*' lar ve *Azotobacter*' lerin EPS ürettikleri bilinmektedir [37]. Bakteriyel EPS' lerin çoğunluğu düzenli oligosakkaridlerin tekrarlanan birimlerinden oluşmuş heteropolisakkarit yapıda, bazı bakteriyel EPS' ler ise tek tip şekerden meydana gelen bir homopolisakkarit yapıdadır. EPS' yi oluşturan homopolisakkaritlerin çoğunluğu nötr olmasına rağmen bir çok bakteriyel EPS negatif yük taşır ve yüksek kütleye sahiptir [38-41]. *In vitro* çalışmalarda EPS' lerin varlığı katı besiyortamlarında mukoid koloni, sıvı besi ortamlarında ise oldukça viskoz bir görünüm ile tespit edilmektedir [42].

Ekzopolisakkaritlerin (EPS) biyosentezi, bir çok bakteri cinsi için oldukça önemli bir özelliktir [43]. Mikroorganizmaların çevrelerine salgıladıkları EPS molekülleri, hücreleri kurumadan, fagositozdan ve faj etkisinden koruduğu, yüksek oksijen gerilimi sağladığı, antibiyotiklere ve toksik maddelere (toksik metal iyonları, sülfür dioksit, etanol gibi) karşı hücreleri koruma ve yüzey tutunmasında yapıştırıcı işlevine sahip olduğu bilinmektedir [44]. Polisakkaritler, bakteri suşlarının çoğalmaları sırasında suşa ve çoğalma evresinin farklı kademelerine göre değişen koşullarda sentezlenir. Heteropolisakkaridler hücre içinde sentezlenirler ve daha sonra hücre dışına çıkarılarak hücrenin etrafını sararlar. Bu işlemler için birçok enzimin varlığına ihtiyaç duyulur. Bu enzimlerden bazıları lipopolisakkaridlerin sentezinde de kullanılmaktadır [42]. EPS sentezinin Sutherland tarafından önerilen genel modele göre gerçekleştiği düşüncesi ağırlık kazanmıştır. EPS' lerin oluşumunda;

- \* UDP-glukoz-dehidrogenaz
- \* glukozil-transferaz
- \* galaktozil – transferaz 1 ve 2
- \* polimeraz gibi polisakkarit sentezine özgü olmayan birçok enzim görev alır [45].

EPS' deki yapısal ve düzenleyici genlerin üretimi kromozomal veya plazmid DNA kodlu olabilir. EPS üretiminin düzenlenmesi oldukça komplekstir ve hem pozitif hem de negatif regülatörler içermektedir. Bu regülatörlerden bazıları global regülatörlerdir. Bunlar hücre dışı enzimler gibi diğer hücre metabolizmalarının sentezini de düzenlemektedir. Osmolarite ve dehidrasyon gibi dış uyarıların etkisiyle EPS üretimi etkilenmektedir [46].

Hücre sel lokasyonları, kimyasal ve fiziksel yapı özellikleri ile fonksiyonları esas alınarak mikrobiyal ekzopolisakkaritleri üç ana grup altında toplamak mümkündür. Bunlar; hücre yüzeyine kovalent bağlarla bağlı olan kapsüler polisakkaritler (CPS), hücre duvarının bir bileşeni olan polisakkaritler (LPS) ve dış çevreye salınan yada hücre yüzeyi ile kovalent olmayan, gevşek bağlarla ilişkilendirilmiş polisakkaritlerdir [47, 48]. CPS ve LPS genellikle üretici bakterilerin patojenitesini belirleyen yapılar olduğundan, tıbbi açıdan büyük önem taşımaktadır. Diğerleri ise gıda endüstrisinde geniş bir kullanım alanı bulunmaktadır [3, 49, 50].

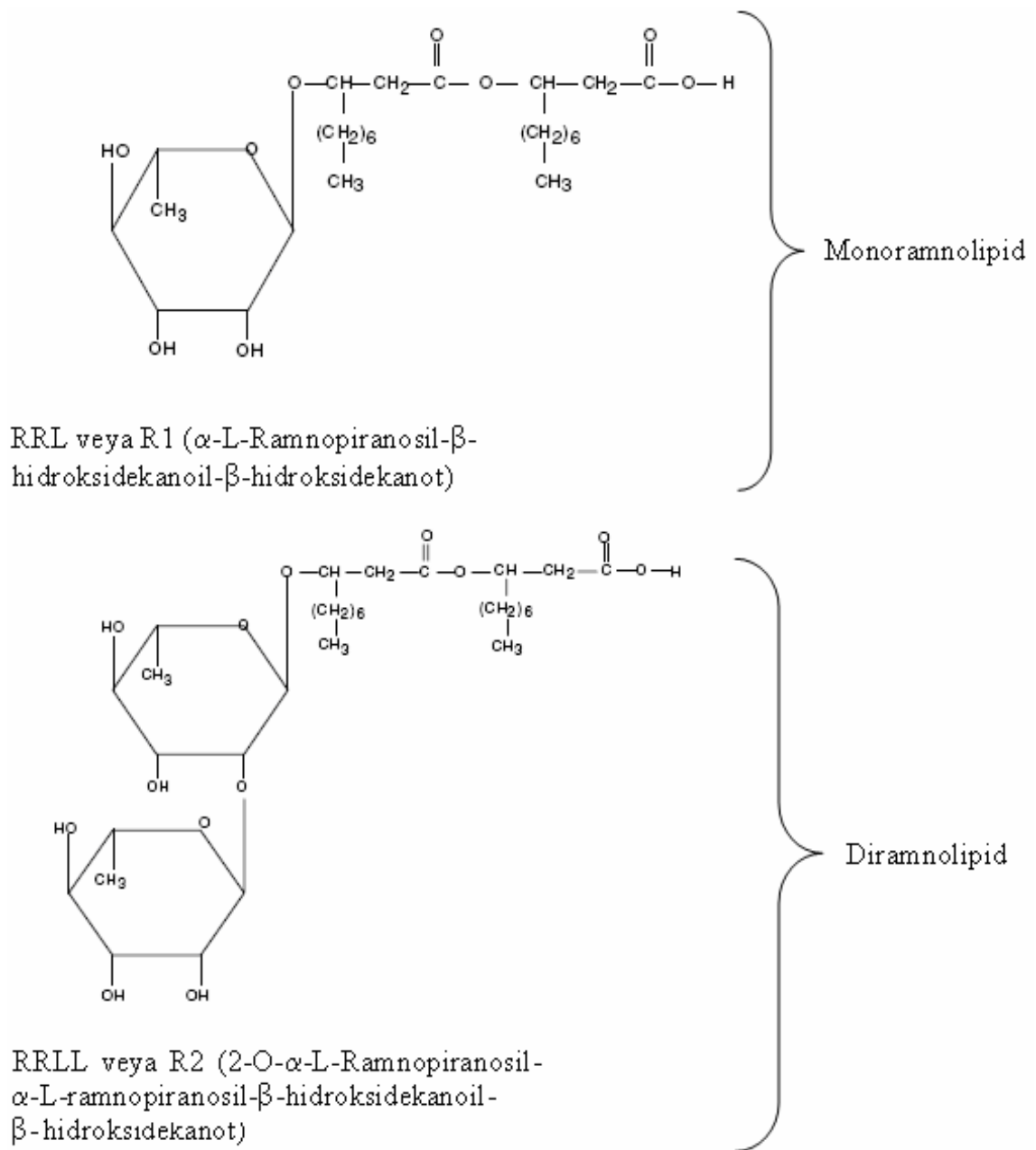
EPS üretimi biyoteknolojide geniş uygulama alanlarına sahiptir [51]. Gıda, farmasötik, petrol endüstrilerinde [52, 53], tekstil, deterjan, atık su iyileştirmeleri, dere yatağı temizlemeleri, mayalanma, akarsu işleme sürecinde, kozmetikte yaygın olarak kullanılmaktadırlar [37, 54]. EPS' nin endüstriyel alandaki önemi, spesifik kimyasal yapısına dayanmaktadır [55]. Mikrobiyal ekzopolisakkaritlerden dekstran, ksantan, gellan, pullulan ve bakteriyel alginatlar endüstriyel açıdan önemli olanlardır. Gıda ve ilaç endüstrisinde ve mikrobiyolojik besiyerlerini katılaştırmak için ticari hale getirilmişlerdir. Ticari mikrobiyal üretim için sadece birkaç polisakkarit yoğun olarak çalışılmıştır: *Leuconostoc* sp. tarafından üretilen dekstran, *Xanthomonas compestris* ' den ksantan gum, *Azotobacter vinelandii* ve *Pseudomonas* sp. tarafından üretilen alginik asit' dir. *P. aeruginosa* tarafından üretilen mukoid ekzopolisakkarid, tekrarlı mannuronik ve glukuronik asit polimerleridir ve alginat olarak isimlendirilirler [56]. EPS' nin endüstriyel kullanımı haricinde klinik açıdan da önemi vardır. Bu açıdan son yıllarda tıp ve farmakoloji alanında da kullanımı gündeme gelmiştir. Anti-tümör [57], antivirüs, ve ateş düşürücü etmen olarak, ilaç sanayisinde kaplama materyali olarak pek çok fizyolojik

aktivitelere katkıda bulunurlar ayrıca interferon, trombosit yığınları birikmesi ve faktör sentezlerini uyaran koloniler için induker olarak kullanılırlar. 40 000-70 000 Da gibi düşük mol ağırlıklı olanlar tıpta en çok kullanılanlardır. Dekstran-demir kompleksi anemi vakalarında, dekstran-kalsiyum kompleksi ise hayvan beslemede hipokalsemi tedavisinde kullanılır. Ağ yapılı sephadex dekstranlar ise, biyolojik maddelerin saflaştırılması ve fraksiyonlara ayrılmasında devreye girerler [38, 58]. Yapılan çalışmalar sonucunda EPS' lerin bağırsak florasını düzenlediği, kolesterolü düşürdüğü ve antiülser aktivitesine sahip olduğu belirlenmiştir [42, 59].

### **2.1.3. *Pseudomonas* spp. suşlarında ramnolipid üretimi**

Sürefektanlar kimyasal yada mikrobial olarak sentezlenebilirler. Kimyasal yöntemlerle üretilen sürefektanlar sentetik sürefektanlar, mikrobiyolojik olarak bir çok farklı mikroorganizma tarafından genelde oksijenli ortamda sentezlenenler ise biyosürefektanlar olarak adlandırılır [60]. Biyosürefektanlar düşük molekül ağırlıklı glikolipidler ve lipopeptidler ile büyük molekül ağırlıklı polimerleri kapsamaktadır.

Biyosürefektanlar bir hidrofobik kısım (uzun zincirli yağ asidi, hidroksi yağ asidi veya  $\alpha$ -alkil- $\beta$ - hidroksi yağ asidi) ile birde hidrofilik kısımdan (karbonhidrat, karboksilik asit, fosfat, amino asit, siklik peptit veya alkol) oluşan amfifilik moleküllerdir [63]. Genellikle yapısında ramnoz şekeri ve  $\beta$ -hidroksidekanoik yağ asitleri içeren biyosürefektanlara ramnolipidler denilmektedir. Eğer yapısında bir tane beş karbonlu ramnoz şekeri ve yağ asidi varsa monoramnolipid, eğer yapısında iki tane ramnoz şekeri ve yağ asitleri varsa di-ramnolipidler denilmektedir (Şekil 2.1). Ramnolipid biyosentezi glikosil transfer reaksiyonları olarak bilinir ve bu reaksiyonları katalize eden spesifik enzim ramnosil transferaz enzimidir. Bu enzim aşağıda gösterilen reaksiyonları katalize ederek ramnolipid biyosentezini gerçekleştirir [64]:



Şekil 2.1. Ramnolipid biyosüpfektananın kimyasal yapısı [64]





kullanım potansiyeli, petrolle kirlenmiş toprak ve suların biyoremediasyonunu, petrol iyileşimini artırmayı, petrolle kirli boruların temizlenmesi için kullanılan klorlu çözücülerin yerine kullanılır [66]. Aynı zamanda biyosürefektanlar gıda sanayisinde katkı maddesi olarak; yağ asit esterleri, gliserol, sorbitol veya etilen glikol ve etilen oksit türevlerinin içeriği ile oligopeptit sentezlenerek kullanılmaktadır. Değişiklik olarak salata sosu olarak *Candida utilis* kullanıldığı gösterilmiştir. Biyosürefektanlar kozmetik endüstrisinde sağlıklı bakım için kullanılmaktadır. Tıp alanında ki kullanımında antibiyotik etkileri ve HIV' in lökositlerde gelişmesini inhibe edici etkileri olduğu literatürlerde yer almaktadır. Bir fosfolipit protein kompleksi olan pulmoner bir sürefektanın eksikliği, prematüre doğan çocuklarda solunum eksikliği nedenidir. *Rhodococcus erythropolis*' in süksinil-trehaloz lipidinin öldürücü bir dozda *Herpes simplex* virüsünü ve influenza virüsünü inhibe ettiği bildirilmiştir. Diğer potansiyel uygulama alanları kağıt hamuru işlemlerinde, boya ve koruyucu maddelerin hazırlanmasında, tekstil de elyaf hazırlanmasında, inşaat malzemeleri olarak beton ve seramik, makine sanayi, motor yağları, çevre teknolojisi, petrol endüstrisi, tarım, gibi alanlarda, kullanılmaktadırlar [63].

## 2.2. Mikrobiyal Metabolitler

Doğada yaygın olarak bulunan bir çok mikroorganizma ticari olarak önemli primer (aminoasit, proteinler, karbohidratlar, vitaminler, aseton, etanol, organik asitler v.s) ve sekonder metabolitler (antibiyotikler, toksinler, alkoloitler v.s) üretirler. Primer metabolitler, bakteri gelişimine paralel olarak mikroorganizmanın gelişme fazının başlangıcında oluşurken, sekonder metabolitler, sıklıkla gelişme fazının sonuna doğru ya da durgun fazda sadece bazı mikroorganizmalar tarafından üretilir ve bakteri gelişimi ve üremesi için gerekli değildir [67].

Tipik bir mikrobiyal üretimde, primer büyüme fazı esnasında alkol fermantasyonunda olduğu gibi ürün (etanol) oluşur. Metabolitlerden sekonder metabolit denilen ikincil metabolitlerin birçoğu önemli metabolitler olup, endüstriyel alanda oldukça önem taşımaktadırlar. Sekonder metabolitlerin temel özellikleri;

- Sekonder metabolitler gelişme ve reproduksiyon için gerekli olmayan bir özelliktedirler.
- Sekonder metabolitler, ekstra büyüme şartlarında özellikle besiyerinin bileşimine bağlı olarak oluşur.
- Sekonder metabolitler, bir grup ile yakından ilişkili olarak sıklıkla üretilir. Örneğin, *Streptomyces*'in bir türünün tek bir suşun, 30'un üzerinde ürünle ilişkili olduğu bulunmuştur. Fakat bunlar, farklı antraksilin antibiyotikleridir.
- Sıklıkla sekonder metabolitlerin yüksek üretimi mümkün iken, genellikle primer metabolitlerin yüksek oranda üretilmeleri mümkün değildir [68].

### **2.2.1. *Pseudomonas* cinsi bakterilerin sekonder metabolitleri**

Mikroorganizmalar tarafından üretilen sekonder metabolitler biyolojik olarak aktif bileşiklerin zengin bir kaynağını sunarlar [69]. Mikrobiyal sekonder metabolitler, bir çok yönde insanlık için önemli olan enzimler, pigmentler ve antibiyotikleri içerir [70]. Sekonder metabolitlerin, toplumun ekonomisi, beslenmesi ve sağlığı üzerine büyük etkileri vardır. Genel olarak sıradışı yapılara sahiptirler ve oluşumları besinler, büyüme oranı, feedback kontrol, enzim aktivasyonu ve enzim indüksiyonu ile düzenlenmiştir. Sekonder metabolitlerin sentezi sıklıkla kromozal DNA ve nadiren plasmid DNA daki genler tarafından kodlanmıştır. Primer metabolizmadan farklı olarak sekonder metabolizma süreçleri hala tam anlamıyla anlaşılabilir değildir. Bu yüzden sekonder metabolitler enzimoloji, kontrol ve farklılaşma üzerine temel araştırmalar için fırsatlar sağlar. Sekonder metabolizma besin, biyosentez, indükleyicilerin ilavesi ile veya gelişim oranındaki azalma ile ortaya çıkar [71].

Bir çok sayıda bakteri ve mantar sekonder metabolit adı verilen metabolizma atıkları üretmektedirler ki, bu metabolitlerin çoğu tedavi amaçlı, uyarıcı, yem ilavesi v.s. amaçlar için kullanılmaktadır. Antibiyotik ve diğer sekonder metabolitler mikroorganizmaların ticari önemini artırmaktadır [22]. Sekonder metabolizmada ki çalışmalar için suşların yüksek üretim kapasitesi ve endüstriyel önemleri sekonder metabolit seçiminde önemlidir [22].

Antibiyotikler, biyolojik kökenli ve düşük konsantrasyonlarda bile mikroorganizmaların gelişmesini engelleyen bazı mikroorganizmaların ürettiği sekonder metabolitlerdir. Genelde engelleyici ve öldürücü etkilere sahiptirler. Antibiyotik oluşturma yeteneği genelde; *Aspergillus*, *Penicillium* ve *Fusarium Actinomycetes* grubuna giren mantarlarda ve bazı bakterilerde vardır. Bugüne kadar sekonder metabolit üreten 2000' nin üzerinde bakteri karakterize edilmiştir. Mikroorganizmalar yardımı ile özellikle *Pseudomonas* cinsine ait türlerden çok sayıda sekonder metabolit özellikle polisakkaridler, antibiyotikler, enzimler, antigenler, ve zehirler üretilmektedir [72, 17].

*Pseudomonas* spp.' lerden metabolitlerin tedavi amaçlı kullanımındaki araştırmalar ilk kez 80 yıl öncesine dayanmaktadır. O zamandan bu yana izole edilen önemli miktarlardaki antibiyotik bileşikler arasında Piyosiyanın, piyrolnitrin ve pseudomonik asit pratik uygulamalarda kullanılmıştır. *Pseudomonas* spp.' ların sekonder metabolitleri hakkındaki araştırmaların bir çoğu saf ürünlerin izolasyonu sonrasında terk edilmiştir. Fenazin ve piyrolnitrin sentezinin haricinde sekonder metaolizmanın biyosentezi, genetiği ve regülasyonu hakkındaki mevcut bilgiler çok azdır. Yinede *Pseudomonas* spp.' ların biyokimyası ve genetiği üzerine yapılan araştırmalara sekonder metabolitler ile ilgili olan araştırmaların katılması, sekonder metabolizmanın aydınlatılması açısından önemlidir [22]. Bazı araştırmacılar tarafından organik bileşiklerle kirlenmiş alanlardan izole edilen *Pseudomonas* cinsine ait türlerin bu ortamda ki rekabet ve canlılıkları için bi takım metabolitler ürettikleri ve *P. aeruginosa'* nın doğal çevrelerde uzun süreli canlı kalabilmesinin tamamen sekonder metabolizmalarına bağlı olduğu bildirilmiştir [73]. Son yıllardaki çalışmalar yabani tip *Pseudomonas'* ların pigmentlerinin, bu *Pseudomonas'* ların pigment oluşturmeyen mutant suşları arasındaki gelişim ve rekabete odaklanmıştır ve pigment oluşturan yabani tip *Pseudomonas'* ların mutantlarına göre çevrede canlı kalabilme şansının daha yüksek olduğu bildirilmiştir [22].

*Pseudomonas* cinsi bakterilerin ürettiği pigmentlerin tedavi amaçlı antibiyotik olarak kullanımının yanı sıra bu bakterilerin ürettiği antibiyotik benzeri fenazin [18] ve sideroforlar [17] gibi antimikrobiyal maddelerin bir çok kök patojenin

baskılanmasında da rol aldığı belirlenmiştir. Bundan dolayı antibiyotik üreten *Pseudomonas*' ların etkin bir biyolojik kontrol ajanı olarak kullanımı ön görülmektedir [20].

Son yıllarda ki araştırmalar, *Pseudomonas* spp. tarafından üretilen ekzopolimerlerin ve biofilmlerin çevresel önemine dikkat çekmektedir. EPS' nin yüzey ve ara yüzey gerilimini azaltarak kirli alanların temizlenmesi (biyoremediasyonu) ve bir çok endüstriyel uygulamalarda kullanılan biyoemülsülfeye aktivitesini bildirmişlerdir [74].

Buna ilaveten son yıllardaki çalışmalar organik bileşiklerin ortadan kaldırılması için topraktaki bu bileşikleri parçalayan ve eriten biyoremediasyonda kullanım potansiyeline sahip [14] *Pseudomonas* cinsi bakterilerin biyosüर्फektan üretimlerini bildirmiştir [75]. Ramnolipid biyosüर्फektanlar, kontamine olmuş bölgelerde kirlenmeyi azaltan maddelere, terminal elektron tutuculara veya besin ve diğer temizleyici maddelere ilave edilerek kirlenici maddelerin parçalanmasını arttıran ve çevrenin kendi kendisini yenilemesini sağlayan bileşiklerdir [76]. Organik bileşiklerle kirlenmiş topraklarda ramnolipid biyosüर्फektanların eklenmesinin biyolojik parçalanmayı arttırması ile ilgili bir çok çalışma bulunmaktadır [64, 66, 77].

### **2.3. Organik Bileşiklerin Biyolojik Olarak Parçalanması**

Biyolojik olarak parçalanabilen bileşikler, mikroorganizmanın hücre dışı enzimlerine bağlanıp hücre membranından geçerek hücre içerisine taşınıp bir seri dönüşüm reaksiyonları ile gerçekleşmektedir. Bu reaksiyonlar esnasında enerji açığa çıkmaktadır. Açığa çıkan enerji hücrelerin çoğalmasında, onarılmasında, bileşiklerin hücreye taşınmasında ve hareket etmesinde kullanılmaktadır. Organik bileşiklerin CO<sub>2</sub> ve H<sub>2</sub>O' ya dönüştüğü durumda parçalanma gerçekleşmektedir. Biyolojik parçalanma her zaman CO<sub>2</sub> ve H<sub>2</sub>O oluşumu ile sonuçlanmamaktadır. Biyoremediasyon süresince kirlilik yaratan organik bileşiğin molekül yapısında meydana gelen değişiklik sonucu farklı ürünler oluşabilmektedir. Mikroorganizmalar

organik bileşikleri 3 farklı şekilde biyolojik olarak parçalayabilirler; aerobik, anaerobik ve fermantasyon [78].

### **2.3.1. Organik bileşiklerin aerobik parçalanması**

Aerobik parçalanma çeşitli mikroorganizmalarla (bakteri ve fungi) oksijen varlığında gerçekleştirilir. Aerobik parçalanma esnasında oksidasyon-indirgenme reaksiyonları meydana gelir ve bu reaksiyonlarda moleküler oksijen terminal elektron alıcısı olarak, kirletici organik bileşik ise elektron vericisi olarak kullanılır. Aromatik hidrokarbonların oksidasyonunda oksijen, hidroksilasyon ve aromatik halkanın kırılmasında anahtar bir role sahiptir. Halkanın enzimatik olarak kırılması için aromatik çekirdek üzerinde iki hidroksil grubu olmak zorundadır. Metabolik yol organizmaya ve halkanın kırıldığı yere göre değişir [79]. Dioksijenaz ve oksijenaz organik bileşiklerin dönüşümü ve mineralizasyonu süresince aerobik mikroorganizmalar tarafından kullanılan iki temel enzimdir. İki enzim arasındaki fonksiyonel farklılık sübstrata katılan moleküler oksijenin atom sayısıdır. Aromatik ve alifatik bileşiklerin ikisinde monooksijenaz tarafından sübstrat olarak kullanılabilir. Dioksijenaz tarafından kullanılan bileşikler ise sadece aromatik bileşiklerdir. Aerobik bozunma anaerobik parçalanmaya göre daha verimli ve hızlı gerçekleşmektedir [80].

### **2.3.2. Organik bileşiklerin anaerobik parçalanması**

Oksijenin olmadığı durumlarda mikroorganizmalar tarafından biyolojik parçalanma anaerobik parçalanma ya da fermentasyonla gerçekleştirilir. Organik bileşiklerin anaerobik parçalanmasında elektron alıcısı olarak nitrat, sülfat ve karbondioksit gibi inorganik bileşiklerin son elektron alıcısı olarak kullanıldığı oksidasyon indirgenme reaksiyonları oluşmaktadır. Bu reaksiyonlarda da organik bileşikler elektron vericisi ya da enerji kaynağı olarak kullanılmaktadır. Nitratı elektron alıcısı olarak kullanan bakteriler nitrat indirgeyici bakteriler olarak adlandırılmaktadır ( $\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NO}_2^-$ ). Aşırı derecede anaerobik bakteriler ise sülfatı elektron alıcısı olarak kullanabilmekte ve bu bakteriler sülfat indirgeyici bakteriler olarak adlandırılmaktadırlar. Sülfat indirgenmesi sonucu sülfür oluşmaktadır. Karbondioksit ise aşırı derecede anaerobik

metanojenik bakteriler tarafından elektron alıcısı olarak kullanılmakta ve CO<sub>2</sub> metana (CH<sub>4</sub>) kadar indirgenmektedir [81].

### **2.3.3. Organik bileşiklerin fermentasyon yolu ile parçalanması**

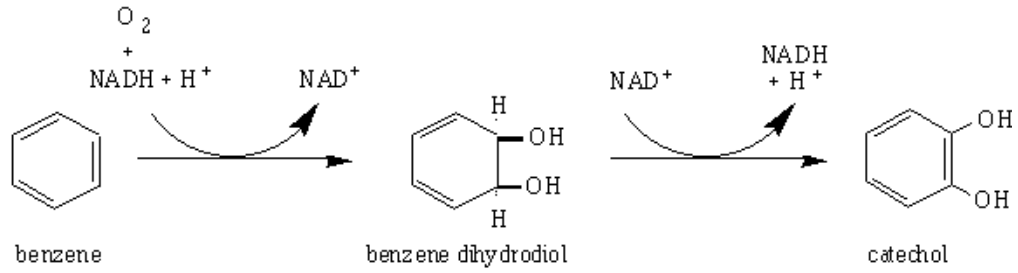
Bir çok mikroorganizma oksijenin elektron alıcısı olarak kullanılmadığı çevrelerde üremeleri için gerekli enerjiyi organik karbonun fermentasyon yoluyla sağlamaktadırlar. Fermentasyon süresince zorunlu ve fakültatif anaerob bakteriler organik bileşiklerini elektron alıcısı ve vericisi olarak kullanırlar [82].

### **2.4. Biyolojik Olarak Parçalanabilen Aromatik Hidrokarbonlar**

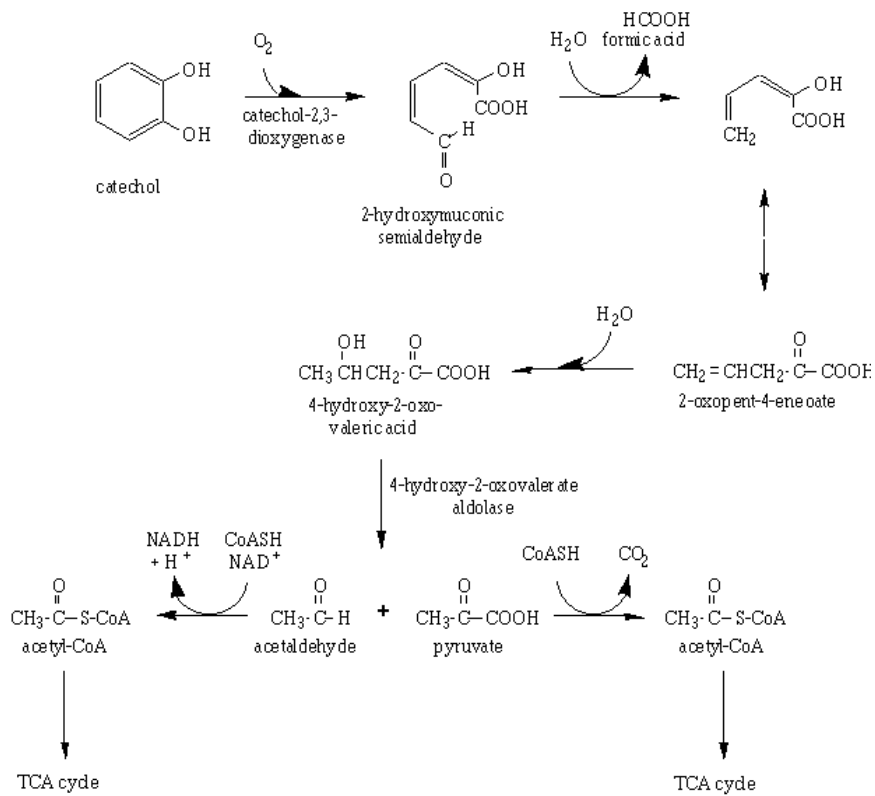
Aromatik bileşikler genellikle benzer kimyasal özellikler sergileyen benzen ve türevleri olarak tanımlanmışlardır. Çok önemli olan aromatik petrol hidrokarbonları arasında, benzen, toluen, etilbenzen, ksilen ve polisiklik aromatik hidrokarbonlar (naftalin) bulunmaktadır. Bütün aromatik hidrokarbonlar benzenin türevleri oldukları için benzenin özellikleri önem arz etmektedir. Benzenin kimyasal formülü C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>'dır ve 3 karbon-karbon çift bağı ile bağlı 6 üyeli bir halkadır [83].

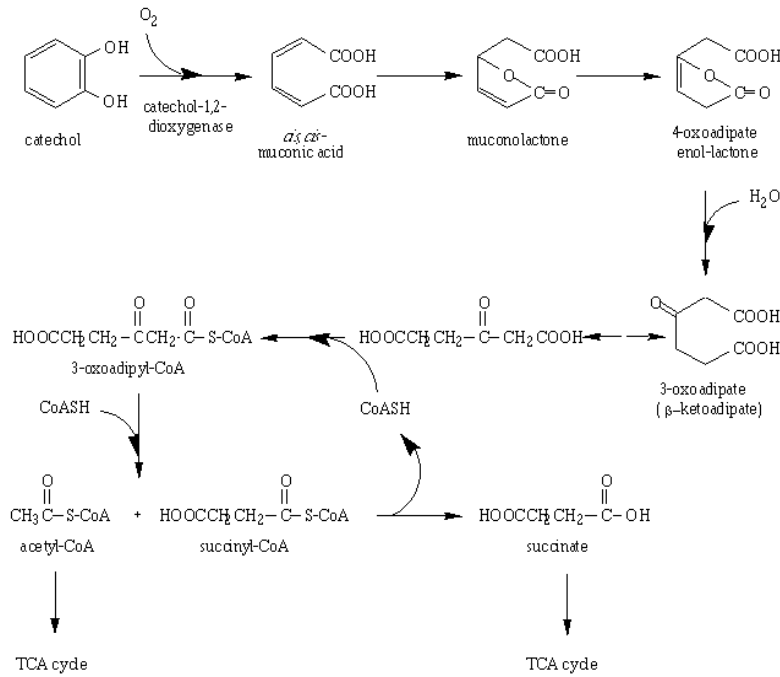
Toprak mikroorganizmalarının geniş bir grubunun sadece % 0,5' inin benzeni kullanabildiği ve benzeni degrade edebilen bir çok mikroorganizma arasından *P. rhodochrous* ve *P. aeruginosa*'nın benzeni katekol ve cis,cis-mukonoik asite kadar metabolize edebilecekleri bildirilmiştir [78].

Mikroorganizmalar BTX bileşiklerini biyolojik olarak parçalayarak daha kolay kullanabilecekleri çeşitli bileşiklere dönüştürürler. Bu dönüşüm çeşitli mikroorganizmalarla aerobik ve anaerobik ortamda gerçekleştirilebilir. Aerobik olarak gerçekleşen biyolojik parçalanma, anaerobik ortamda gerçekleşen biyolojik bozunmaya oranla daha kısa sürede gerçekleşmekte ve bileşiklerin parçalanma yüzdeleri daha yüksek olmaktadır [82].



Şekil 2.2. Katekole benzenin oksidasyonu

Şekil 2.3. Katekol katabolizması için *Meta*- kırılma metabolik yolu



Şekil 2.4. Katekolün katabolizması için *Orto*- kırılma metabolik yolu

İlk olarak Şekil 2.2’de genel olarak benzenin biyolojik parçalanması gösterilmiştir. Benzen tek bir aromatik halkadan ibarettir. Benzen halkasına moleküler oksijenin iki atomu katılır ve bakterilerle başlangıç oksidasyon reaksiyonu gerçekleşmektedir. Başlangıç oksidasyon işleminden dioksijenaz enzimi sorumludur. Ve reaksiyon ürünü olarak *cis*-benzen dihidrodiol bileşiği oluşmaktadır. *Cis*-benzen dihidrodiol bileşiği başka bir oksidasyona uğrayarak hidroksilli türevi olan katekol bileşiğini oluşturmakta ve bu şekilde aktif hale gelmektedir [80]. Daha sonra katekol dioksijenaz enzimi ile katekol bileşiğinde mevcut halkanın kırılması gerçekleşmektedir. O<sub>2</sub> iki şekilde halkaya katılarak halkanın kırılmasını sağlamaktadır. Eğer oksijen bir hidroksil grubu ile ona komşu karbon atomu arasındaki bağa katılarak kırılma sağlarsa buna *meta* kırılması denir (Şekil 2.3). Bu halkanın kırılmasından sorumlu enzim katekol 2,3-dioksijenaz’ dır. Bu şekilde halkanın kırılması ile 2-hidroksimukonik semialdehit oluşmaktadır. Ve bu bileşik piruvat ve asetaldehite kadar bozunmaktadır. O<sub>2</sub> iki hidroksil grubu arasındaki bağa katılarak bağın kırılmasını sağlarsa da buna *orto*-kırılması denir (Şekil 2.4). Bu işlemde de katekol 1,2-dioksijenaz enzimi sorumludur. Halkanın kırılması ile



mukonat bileşiği oluşmaktadır. Bağın kırılması gerçekleştikten sonra ise piruvat ve asetaldehite kadar bozunma devam etmektedir [84].

Bu bileşikler *Pseudomonas*, *Achromobacter* ve *Nocardia* cinsine ait üyeleri içeren bakteri türleri için karbon ve enerji kaynağı olarak hizmet etmektedirler [83]

Bir çok araştırıcı monoaromatiklerden Benzen (B), toluen (T), ksilen (X) ve fenolün biyodegradasyonunu çalışmışlardır. BTX ve fenolü değrede edebilen mikroorganizmaları izole etmişler, degradasyon kinetiklerini araştırmışlar ve bu bileşiklerin biyodegradasyonda mikrobiyal rekabet ve adaptasyonu, kirlilik konsantrasyonu, sıcaklık, pH ve sübatrat etkileşimi gibi çevresel faktörleri incelemişlerdir [85, 86, 87].

Aromatik hidrokarbonların miktarı ile çeşitliliği endüstriyel aktiviteler nedeniyle yıllardır artmaktadır. Bu nedenler, çok sayıda toprak ve yer altı suyu arıtma, taşınım, kullanım, petrol ürünlerinin dışa atımı gibi endüstriyel aktiviteler nedeniyle petrol hidrokarbonlarıyla kirlenmektedir. BTX grubu kirleticiler benzen, toluen, etilbenzen ve üç ksilen izomerinden (o-, m-, p-Ksilen) oluşmaktadır. Bu organik bileşikler petrol ürünlerinin önemli bir yüzdesini oluşturmaktadır. Diğer yandan, bu bileşikler yaygın olarak endüstride çözücü olarak ve ecza maddelerinin, polimer ile renklendiricilerin üretimi için çıkış maddesi olarak kullanılmaktadır [85]. Organik çözücülerde çözünmektedirler [86]. Tüm BTX bileşikleri uygun laboratuvar koşullarında aerobik ve anaerobik mikroorganizmalarla biyolojik olarak paralanabilmektedirler [88].

Biyoremediasyonu en çok çalışılan bileşiklerdir. Çünkü önemli ölçüde evre kirliliğine yol açan benzin ve diğer yakıtlarda bulunmaktadırlar. Yakıtlarda bulunan diğer hidrokarbonlara oranla sudaki çözünürlükleri daha yüksektir. Yer altı suları ile uzak mesafelere taşınabilmektedirler. İçme sularına karışma olasılıkları daha yüksektir. Çok küçük derişimlerinde bile kanserojendirler. U. S. EPA (Environmental Pollution Agency) tarafından çok küçük derişimlerinde bile tehlikeli ve kanserojen oldukları kesin olarak belirlenmiştir [89].

## 2.5. Biyolojik Olarak Parçalanabilen Herbisitler

Pestisitler tarım alanlarındaki zararlı böcek, ot vs.' yi uzaklaştırmak, tarım ürünlerinin nitelik ve niceliklerini artırmak ve sınırlı olarak da diğer endüstriyel amaçlar için kullanılan kimyasal maddelerdir. Pestisitleri etki alanlarına göre insektisitler (böcek öldürücüler), herbisitler (zararlı ot öldürücüler), fungusitler (fungus öldürücüler) vs. olmak üzere sınıflandırılmaktadır [90].

Herbisitler, yabancı otların yeryüzünde çok fazla alanda bulunmaları nedeniyle pestisitler içerisinde en fazla kullanılan kimyasallardır. Genel anlamda yabancı otları öldürmede veya normal gelişimini önlemede kullanılan kimyasal maddelerin tümüne birden herbisit adı verilmektedir. Herbisit kullanımı ile tarımda ürün kalitesi ve miktarı artarken diğer yandan gerek üründe herbisit artıklarının kalması, gerekse toprakta birikmesi ve çevrede uzun süre stabil halde bulunması çevre problemlerinin ortaya çıkmasına sebep olmuştur. Dolayısıyla herbisitlerin çevredeki davranışları, degradasyonları ve biyolojik organizmalar üzerindeki etkileri büyük araştırma alanları oluşturmuştur. Özellikle 2,4-D, Dalapon, Maleik hidrazid ve Klorin gibi herbisitler bu alanda yaygın bir kullanım alanına sahiptir. Kısaca 2,4-D olarak adlandırılan 2,4-Diklorofenoksiasetik asitin formülü şu şekildedir: Asit:  $C_8H_6Cl_2O_3$ , İsopropil ester:  $C_{11}H_{12}Cl_2O_2$ . 2,4-D' nin fiziksel ve kimyasal özellikleri Çizelge 2.1' de verilmiştir [91, 92].

2,4- D' nin de içinde bulunduğu klorfenoksiasetatlar, genel olarak klonlandırılmış hidrokarbonlar başlığı altında toplanmaktadır. Mikrobiyal yıkıma uğratılabilen klonlandırılmış hidrokarbonlar, 3 sınıfa ayrılarak incelenmektedir; 1- Halojenlendirilmiş alifatik hidrokarbonlar, 2- Klorlanmış polisiklik hidrokarbonlar, 3- Klorlanmış aromatik hidrokarbonlar. 2,4-D, klorlanmış aromatik hidrokarbonlara dahildir [93].

Çizelge 2.1. 2,4-D' nin fiziksel ve kimyasal özellikleri [91]

IUPAC sistemine göre adı	2,4-Diklorfenoksiasetik asit
Erime noktası	140,5 °C
Buhar basıncı (20 °C)	Sıfır
Çözünürlüğü (25 °C)	620 mg/L
LD <sub>50</sub> (ratlarda)	375 mg/kg
LD <sub>50</sub> (ratlarda, sodyum tuzu)	666-805 mg/kg
LD <sub>50</sub> (ratlarda, isopropilester)	700 mg/kg
Kimyasal karakteri	Anyon, asit
MAC. Tolerans (Hava)	10 mg/m <sup>3</sup>
Tolerans (narenciye ve meyvelerde)	2 ppm
Tolerans (diğer bitkisel gıdalarda)	0,1 ppm

Klorlandırılmış aromatik hidrokarbonlar, toksik ve degradesyona dirençli olmaları nedeniyle, çevre kirleticilerinin büyük bir grubunu oluşturmakta, sedimentlerde ve canlılarda birikim göstermektedir. Sucul mikroorganizmalar ve toprak mikroorganizmaları, bu bileşiklerden bazılarını oldukça uzun sürede parçalarken, diğer bir bölümünü ise daha hızlı yıkabilmektedir. Mikroorganizmalar, yabancı bir bileşikle karşı karşıya kaldıklarında, kendi metabolik yolları dışında alternatif yeni metabolik yollar geliştirebilmektedirler [94]. Klorlanmış aromatik maddelerin degradasyonu için metabolik yollara ilişkin bir çok araştırma yapılmıştır [95-97].

Toprak, ve su mikroorganizmalarının klorotoluen, klorobenzen, klorobenzoat, klorofenol, klorasetamid, 4-klorofenilasetat gibi klorlanmış aromatik hidrokarbonları parçalamalarıyla ilgili çalışmalar bulunmaktadır [94].

Saf ve karışık kültürlerle yapılan bir çok çalışmada, 2,4-D' nin karbon ve enerji kaynağı olarak kullanılabildiği ve bu türlerin *Arthrobacter*, *Pseudomonas*, *Xanthobacter* ve *Alcaligenes* cinslerine ait olduğu belirtilmiştir [98-100].

2,4-D degradasyonu ile ilgili olan genetik bilginin plazmidde taşındığını ilk olarak Pemberton ve Fisher (1977) bildirmiştir [101]. Bir çok *Pseudomonas* ve *Alcaligenes* türünün 2,4-D' yi degradasyon yeteneği, plazmidlerinden kaynaklanmaktadır. Bunların bir çoğunun özellikleri oldukça iyi araştırılmıştır. Bu plazmidler, çeşitli bakteri türlerine konjugasyon yoluyla transfer edilebilmektedir. 2,4-D degradasyonu yaptığı bilinen *Alcaligenes eutrophus* JMP 134 genetik açıdan iyi incelenmiştir [102]. 2,4-D degradasyonu için gerekli olan enzimler JMP 134' ün pJP4 plazmidinde yer almaktadır [103, 104].

Tarımda sıklıkla kullanılan bir herbisit olan 2,4-D' nin, çevredeki kalıcılığı üzerindeki ilginin nedenlerinin başında çevredeki hareketliliği, karasal ve deniz ekosistemindeki birikimi ve insan sağlığına etkileri gelmektedir [105]. Adsorbsiyon, herbisit moleküllerinin fiziksel ve kimyasal olarak toprak kolloidlerine sıkıca bağlanmaları olayı olup herbisitlerin toprakta taşınmasında, parçalanmasında ve bitkiler tarafından alınmasında önemli rol oynar. 2,4-D' nin sudaki çözünürlüğü de adsorbsiyonu etkilemektedir. 2,4-D' nin tuz formununun toprakta daha kolay süzülmesi bildirilmiştir [106]. 2,4-D' nin eter ve amin tuzları bir çok toprakta anyona kadar indirgenen hızlı bir ayrışma ve hidrolize uğramaktadır. Buna karşın isocitil esteri toprakta birkaç günden 4-5 haftaya kadar uzayabilen bir kalıcılığa sahiptir [107].

2,4-D' nin aerobik degradasyonundaki metabolik yollardaki başlıca farklılıklar klorun aromatik halkadan ayrılması aşamasında olmaktadır. Bu ayrılma 2,4-D, 2,4-diklorofenol (2,4-DCP) ya da 3,5-diklorokatekolün 4 pozisyonundaki Cl<sup>-</sup> iyonunun ayrılması şeklinde olabilmektedir. Aromatik halka ayrılmasından önce meydana gelen klor ayrılması reaksiyonu, *Pseudomonas* cinsi bakterilerin yanı sıra *Arthrobacter*, ve *Nocardia* cinslerine ait bakteri türlerinde ve *Aspergillus niger*' de de belirlenmiştir. *Aspergillus niger*' in 2,4-D' yi karbon ve enerji kaynağı olarak kullanabildiği ve tamamıyla parçalayabildiği yapılan çalışmalarda gözlenmiştir [97].

Genelde fenolden asetik asit yan zincirinin orto hidroksilasyon sonucu ayrılmasıyla tüm aerobik metabolik yolları katekol oluşumu gözlenmektedir. Katekollerden de aromatik halkanın orto-ayrılması sonucu mukonik asit oluşumu görülmektedir. Bu

metabolik yolların son ürünü olan süksinik asit, sitrik asit döngüsüne girmektedir [95-109].

## **2.6. Biyolojik Temizleme (Biyoremediasyon)**

Bir çok toprak ve yer altı suları sızıntılar, yanlış dışa atım teknikleri gibi endüstriyel aktivitelerle çeşitli organik bileşiklerle kirlenmektedir. Bu organik bileşikler hem çevreye hem de insan sağlığına zararlıdır. Çevreye verdikleri bu zararı en aza indirmek için biyolojik ve biyolojik olmayan bir çok işlem yapılmaktadır. Biyolojik olarak yapılan temizleme çeşitli avantajlarından dolayı diğer yöntemlere tercih edilmektedir. Biyoremediasyon işlemi, toprak ve yer altı sularında kirlilik yaratan organik bileşiklerin doğada doğal olarak bulunan mikroorganizmalar tarafından biyolojik olarak parçalanarak çevreye daha az zararlı bileşiklere dönüştürülmesi ile kirlenen bölgelerin temizlenmesi işlemidir. Biyoremediasyon yöntemi, mikrobiyal topluluğun yoğunluğu ve bileşimi, kirlilik yaratan organik bileşiklerin dönüşüm hızı, çevresel faktörler, substrat faktörleri ve mikrobiyal faktörlerden etkilenmektedir. Temel çevresel faktörler nem, havalandırma, sıcaklık, pH ve besin miktarıdır. Toksiklik, derişim, çözünürlük, uçuculuk ve kimyasal yapısı ile ilgili substrat özellikleri de biyolojik dönüşümü etkilemektedir. Mikrobiyal faktörler ise o bileşiği parçalayabilecek mikroorganizmanın varlığı, mikrobiyal topluluğun alıştırılması ve ekolojik faktörlerdir [78].

Biyoremediasyon işleminin çevre kirliliğini gidermek için yararlanılan diğer yöntemlere göre çeşitli avantaj ve dezavantajları söz konusudur. Ekonomik olarak diğer yöntemlere göre daha ucuzdur. Çevre biyoremediasyon işlemlerinden sonra tamamıyla eski halini aldığından, ekolojik açıdan da kabul görmektedir. Hem su hem de toprakta uygulanabilir ve biyoremediasyon işlemi insan sağlığı açısından zararsızdır. Dezavantajları ise; etkinliğini tahmin etmek ve ölçek büyötmek zordur. Sıcaklık, pH, nem içeriği, besin ve oksijen derişimi çevre koşulları ile değişebilmektedir. Kirleticilerin yüksek derişimleri, mikroorganizma üremesi üzerine toksik etki yapabilmektedir. Bazı kirleticiler biyodegradasyonla parçalanmamaktadır. Bu da diğer temizleme işlemlerine oranla daha uzun zaman alabilmektedir [82].

### 3. MATERYAL VE METOT

#### 3.1. Materyal

##### 3.1.1. Materyal örnekleri

Araştırma *Pseudomonas* cinsine ait 6 adet *Pseudomonas aeruginosa*, 4 adet *Pseudomonas fluorescens*, 4 adet *Pseudomonas stutzeri*, 2 adet *Pseudomonas cepecia*, 3 adet *Pseudomonas putida* ve 1 adet *Pseudomonas luteola* olmak üzere toplam 20 adet bakteri suşu ile yürütülmüş olup, Gazi Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoteknoloji Laboratuvarı kültür koleksiyonundan temin edilmiştir. Bu izolatlar atık su ve topraklardan izole edilmiştir. *Pseudomonas* spp. suşlarının Analitik Profil İndeks (API 20NE; Biomerieux, Marcy I' Etoile, France) ve moleküler düzeyde tanımlanması Gazi Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoteknoloji laboratuvarında yapılmıştır.

##### 3.1.2. Araştırmada kullanılan bakterilerin aktifleştirilmesi ve gelişim koşulları

Araştırmada kullanılan *Pseudomonas* cinsi bakterilerin aktifleştirilmesinde Nutrient sıvı besiortamı kullanılmıştır [110].

##### *Nutrient Sıvı Besiortamı*

<u>Maddeler</u>	<u>g/L</u>
Beef Ekstraktı	1,0
Yeast Ekstraktı	2,0
Pepton	5,0
Sodyum Klorür	5,0

Maddeler 1000 mL distile suya ilave edilmiştir. Besiortamının pH' sı 0,01 N HCl ve 0,01 N NaOH' le  $6,8 \pm 0,2$ ' ye ayarlanmıştır. Amaca uygun olacak şekilde besiortamına % 1,5 oranında agar ilave edilip katı besiortamı hazırlanmıştır. Besiortamı 121 °C' de 15 dakika otoklavda steril edilmiştir.

5 mL' lik NB besiortamı içerisinde inokule edilen *Pseudomonas* spp. suşları 37°C' de 24 saat inkübasyona bırakılarak geliştirilmiştir [110].

### **3.2. Metot**

#### **3.2.1. Bakterilerin muhafazası**

Eppendorf tüplerine 0,3 mL gliserol (Merck) konularak, 121 °C' de 15 dakika otoklavda steril edilmiştir. Bakteriler uygun sıvı besiortamında aktifleştirilmiştir. Aktifleştirilen kültürlerden 0,6 mL gliserol içeren steril eppendorflara ilave edilerek -80 °C' de muhafaza edilmiştir. Muhafazaya alınan stoklar iki ayda bir yenilenmiştir [111, 112].

#### **3.2.2. Mac Farland metoduna göre bakterilerin hücre yoğunluğunun belirlenmesi**

Deneysel çalışmalarda *Pseudomonas* cinsi bakteriler 5 no' lu Mac Farland' a göre hücre yoğunlukları ayarlanmıştır.

A çözeltisi (% 1,175 BaCl<sub>2</sub> 2H<sub>2</sub>O) ve B çözeltisi (0,36 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>' den % 1 (v/v) çözelti) Çizelge 3.1' de belirtildiği oranlarda karıştırılarak No:1' den 10' a kadar Mac Farland tüpleri elde edilmiştir.

Nutrient sıvı besiyerindeki aktif kültürler steril pastör pipeti yardımıyla içinde 3 ml fizyolojik su bulunan tüplere damla damla aktarılarak 5 no' lu Mac Farland tüpleriyle eşdeğer bulanıklıkta hücre süspansiyonu elde edilmiştir [113].

Çizelge 3.1. Mac Farland metoduna göre A ve B çözeltilerinin karışım oranları

No	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
A	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9	1,0
B	9,9	9,8	9,7	9,6	9,5	9,4	9,3	9,2	9,1	9,0

A: % 1,175 BaCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O

B: 0,36 N % 1 (v/v) H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

### 3.2.3. *Pseudomonas* spp. suşlarında pigment (piyosiyanın) üretiminin tespiti

Araştırmada kullanılan *Pseudomonas* spp. suşlarının pigment oluşumları için Pseudomonas Agar (PA) Agar, Pseudomonas Gliserollü Agar (PGA), King's B, Muller Hinton Agar, Pseudomonas Agar-P, Pseudomonas Agar Base CN Selective Supplement, besiortamları kullanılmıştır [110].

#### *Pseudomonas Agar Besiortamı (PA)*

<u>Maddeler</u>	<u>g/L</u>
Bacto Pepton	20,0
Magnezyum klorür	1,4
Potasyum sülfat	10,0
Agar	15,0

#### *Pseudomonas Gliserollü Agar (PGA) Besiortamı*

<u>Maddeler</u>	<u>g/L</u>
Bacto Pepton	20,0
Magnezyum klorür	1,4
Potasyum sülfat	10,0
Gliserol	20,0 mL
Agar	15



*King's Medium B Besiortamı*

<u>Maddeler</u>	<u>g/L</u>
Proteaz Pepton no.3	20,0
Gliserol	10,0 mL
Potasyum sülfat	1,5
Magnezyum klorür (7 su' lu)	1,5
Agar	15

*Muller Hinton Agar Besiortamı*

<u>Maddeler</u>	<u>g/L</u>
Beef infüzyon	300,0
Kazeinin asit hidrolizati	17,5
Agar	17,0
Nişasta	1,5

*Pseudomonas Agar-P Besiortamı*

<u>Maddeler</u>	<u>g/L</u>
Proteaz Pepton no.3	20,0
Gliserol	20,0 mL
Potasyum sülfat	10,0
Magnezyum klorür(6 su' lu)	1,4
Agar	15,0

Pseudomonas Agar (PA), Pseudomonas Gliserollü Agar (PGA), King's B, Muller Hinton Agar, Pseudomonas Agar-P besiortamlarını hazırlarken maddeler 1000 mL distile suya ilave edilmiştir. Besiortamının pH' sı 0,01 N HCl ve 0,01 N NaOH' le  $7,0\pm 0,2$ ' ye ayarlanmıştır. Besiortamı 121 °C' de 15 dakika otoklavda steril edilmiştir.

*Pseudomonas Agar Base Besiortamı*

<u>Maddeler</u>	<u>g/L</u>
Jelatin Pepton	16,0
Kazein hidrolizat	10,0
Potasyum sülfat	10,0
Magnezyum klorür	1,4
Agar	11,0

*CN Selective Supplement*

<u>Maddeler</u>	<u>g/L</u>
Setrimit	100,0 mg
Sodyum nalidixat	7,5 mg

*Pseudomonas Agar Base CFC Selective Agar* besiortamı hazırlarken maddeler CN selective supplement hariç 1000 mL distile suya ilave edilmiştir. Besiortamının pH' sı 0,01 N HCl ve 0,01 N NaOH' le  $7,1 \pm 0,2$ ' ye ayarlanmıştır. Besiortamı 121 °C' de 15 dakika otoklavda steril edilmiştir. Besiortamı 45 °C-50 °C' ye kadar soğutulduktan sonra steril şartlarda CN supplement ilave edilerek karıştırılmıştır. Steril şartlarda petri tabaklara dağıtılmıştır.

Araştırmada kullanılan *Pseudomonas* spp. suşlarının pigment oluşumları, suşların pigment üretimlerini aktive eden çeşitli besiortamlarında denenmiştir. Bu amaçla 24 saatlik aktif kültürlerden PA, PGA, King's B Agar, Muller Hinton Agar, *Pseudomonas Agar-P* ve *Pseudomonas Agar Base CN Selective Supplement Agar* besiortamlarına çizgi ekim yapılmış ve 37 °C' de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. *Pseudomonas* suşlarının pigment oluşumları petrillerdeki kolonilerin renk değişimlerine göre kalitatif olarak belirlenirken, pigment oluşturma oranlarında kantitatif olarak belirlenmiştir. Mavi-yeşil renk oluşturan *Pseudomonas aeruginosa* suşlarının piyosiyanın miktarları Essar ve ark. (1986)' nin metoduna göre belirlenmiştir [7]. Suşlar 5 mL NB besiortamında 37° C' de 72 saat geliştirilmiştir. Hücreler 3.000 x rpm' de 15 dakika santrifüj edilerek uzaklaştırılmış ve süpernatantlar üzerine 3 mL kloroform ilave edilmiştir. Sonra üzerine 1 mL 0,2 N HCl konulmuştur. Konsantrasyonlar kültür süpernatantının mL' de ürettiği

piyosiyenin mikrogramı olarak ifade edilmiş ve 17,072' standartına göre [114] OD 520 nm' de artarak belirlenmiştir [7].

#### 3.2.4. *Pseudomonas* spp. suşlarında ekzopolisakkarit (EPS) üretiminin tespiti

Araştırmada kullanılan *Pseudomonas* cinsi bakterilerin EPS üretiminde Nutrient Agar (NA) besiortamı kullanılmıştır [110].

##### *Nutrient Agar (NA) Besiortamı*

<u>Maddeler</u>	<u>g/L</u>
Beef Ekstraktı	1,0
Yeast Ekstraktı	2,0
Pepton	5,0
Sodyum Klorür	5,0
Agar	15

Maddeler 1000 mL distile suya ilave edilmiştir. Besiortamının pH' sı 0,01 N HCl ve 0,01 N NaOH' le  $6,8 \pm 0,2$ ' ye ayarlanmıştır. Besiortamı 121 °C' de 15 dakika otoklavda steril edilmiştir.

Çalışmada kullanılan bakterilerin oluşturduğu EPS miktarı Cérantola ve ark. (2000)' nin metoduna göre belirlenmiştir [115]. Suşlar NA besiortamında 37° C' de 72 saat geliştirilmiştir. Agarlı plaktaki koloniler steril bir cam çubuk yardımı ile toplanarak serum fizyolojikte (% 0,9 NaCl) yıkanmış ve hücre yoğunluğu Macfarland 5' e ayarlanmıştır. Ependorflara 1 mL alınan bakteri hücreleri 15 dk. kaynatılmış ve üzerine 1,7 µL trikloroasetik asit (TCA) ilave edilmiştir. Sonra hücreler 4 °C' de 10.000 x g' de 30 dakika santrifüj edilerek uzaklaştırılmış ve süpernatantlar 4 °C' de % 95' lik etanolde 24 saat bekletilmiştir. Bu işlemle çöktürülen EPS yeniden santrifüj edilerek geri alınmış ve etanollü adım tekrarlanmıştır. Santrifüjden (4 °C' de 30 dak. 12.000 x g) sonra etanol uçurularak pelletler distile suda çözülmüştür. EPS (mg/L) standardı [116] olarak farklı glukoz konsantrasyonları esas alınarak fenol-sülfürik asit (Sigma-Merck) metoduna [117] göre belirlenmiştir. Kültürlerin

ortamlarındaki EPS değerleri 490 nm' de spektrofotometrik (Hitachi UV/VIS 1800 spectrophometer) olarak ölçülmüştür.

### **3.2.5. *Pseudomonas* spp. suşlarında ramnolipid biyosürefektan üretiminin tespiti**

Araştırmada kullanılan *Pseudomonas* cinsi bakterilerin ramnolipid üretiminde Nutrient Broth (NB) besiyortamı kullanılmıştır [110].

Bu amaçla *Pseudomonas* spp. 50 mL NB besiyortamında 37 °C' de 72 saat çalkalamalı etüvde (100 rpm) inkübasyona bırakılmıştır. Gelişen kültürler toplanarak hücre yoğunluğu Macfarland 5' e ayarlanmıştır. 6000 rpm' de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Böylece kültür ortamı bakteri hücrelerinden ayrılmıştır ve daha sonra 50 mL' lik süpernatantı evaporasyon edilmiştir [118]. Evaporasyon sonrası hücre ekstraktı üzerine 50 mL distile su ilave edilmiştir. Biyosürefektan (ramnolipid) miktarının tayini için ramnolipid (g/L) standardı fenol-sülfürik asit metodu kullanılarak farklı ramnoz konsantrasyonları esas alınarak fenol-sülfürik asit (Sigma-Merck) metoduna [117] göre belirlenmiştir. Kültürlerin ortamlarındaki ramnolipid değerleri 480 nm' de spektrofotometrik (Hitachi UV/VIS 1800 spectrophometer) olarak ölçülmüştür.

### **3.2.6. İstatiksel analiz**

Çalışmada ki istatiksel analizler SPSS (Version, 11.0)' e göre yapılmıştır. *Pseudomonas* spp. suşlarının piyosiyanın ve ramnolipid üretimleri, bununla birlikte organik kirleticilerdeki bakteriyal gelişimleri ve EPS üretimleri arasındaki ilişkinin anlamlı olup olmadığını belirlemek için Person's korelasyonu kullanılmıştır. Anlamlılık  $\alpha = 0,01/0,05$  seviyesinde belirlenmiştir.

### 3.2.7. Organik bileşiklerin (2,4-D, Benzin, BTX, Benzen) *Pseudomonas* spp. suşları üzerine Minimum İnhibitör Konsantrasyonunun (MİK) belirlenmesi

Araştırmada kullanılan organik bileşiklerin (2,4-D herbisiti için 100-1000 ppm, Benzin, BTX, Benzen için ise % 1-5 v/v) Minimum İnhibitör Konsantrasyon (MİK) değerleri *Pseudomonas* suşlarının 5 mL' lik NB besiortamında 37 °C, 24 saatlik inkübasyon sonrasında belirlenmiştir [119]. Buna göre farklı konsantrasyonlarda ki organik bileşikler NB besiortamına ilave edilmiş ve NB besiortamında 37 °C' de 24 saat geliştirilmiş aktif bakteri kültürlerinden 0,1 mL olacak şekilde inokulasyonlar yapılmıştır. Kontrol olarak da organik bileşikleri içermeyen 0,1 mL bakteri kültürü ilave edilmiş NB besiortamı kullanılmıştır. Bakteri inoküle edilmiş kontrol ve organik bileşikli besiortamları 37 °C' de 24 saat süreyle inkübe edilmiş ve tüplerde bakteriyal gelişmenin inhibe edildiği en düşük konsantrasyonlar (MİK) tayin edilmiştir.

### 3.2.8. *Pseudomonas* spp. suşlarının bazı organik kirleticileri biyodegradasyonu

Araştırmada kullanılan bakterilerin biyodegradasyon çalışmalarında Mineral Salt Media (MSM) besiortamı kullanılmıştır [110].

#### *Mineral Salts Besiortamı*

<u>Maddeler</u>	<u>g/L</u>
Sodyum monohidrojen fosfat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	4,0
Potasyum dihidrojen fosfat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	1,5
Amonyum klorür (NH <sub>4</sub> Cl)	1,0
Magnezyum sülfat heptahidrat (MgSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O)	0,2
Ferrik Amonyum Sitrat (C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub> FeNH <sub>3</sub> )	5 mg
Modifiye edilmiş Hoagland eser element solusyonu	1 mL

*Modifiye edilmiş Hoagland eser element solusyonu*

<u>Maddeler</u>	<u>g/3,6 L</u>
Bor trihidrür (BH <sub>3</sub> )	11
Mangan (II) klorür tetrahidrat (MnCl <sub>2</sub> . 4H <sub>2</sub> O)	7
Alüminyum klorür (AlCl <sub>3</sub> )	1
Kobalt (II) klorür (CoCl <sub>2</sub> )	1
Bakır (II) klorür (CuCl <sub>2</sub> )	1
Potasyum iyodür (KI)	1
Nikel (II) klorür (NiCl <sub>2</sub> )	1
Çinko klorür (ZnCl <sub>2</sub> )	1
Baryum klorür (BaCl <sub>2</sub> )	0,5
Potasyum bromür (KBr)	0,5
Lityum klorür (LiCl)	0,5
Sodyum molibdat (Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> )	0,5
Selenyum tetraklorür (SeCl <sub>4</sub> )	0,5
Kalay (II) klorür dihidrat (SnCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O)	0,5
Sodyum Vanadat monohidrat (NaVO <sub>3</sub> .H <sub>2</sub> O)	0,1

Maddeler 999 mL distile suya ilave edilmiştir. 1 mL Modifiye edilmiş Hoagland eser element solusyonu ilave edildikten sonra besiortamının pH' sı 0,01 N HCl ve 0,01 N NaOH' le 7,0±0,2' ye ayarlanmıştır. Besiortamı 121 °C' de 15 dakika otoklavda steril edilmiştir.

Benzin, BTX, Benzen ve 2,4-D' nin *Pseudomonas* kültürleriyle biyodegradasyonun belirlenmesi, sabit sıcaklık ve sabit karıştırma hızındaki orbital çalkalayıcıda (37 °C, pH 7' de ve 100 rpm), 250 mL' lik erlenlerde 50mL MSM besiortamında gerçekleştirilmiştir. 121 °C 15 dakika steril edilmiş olan MSM besiortamı içerisine uygun konsantrasyonlarda ki organik bileşikler (2,4-D için 50 ppm, Benzen için % 2 v/v, BTEX ve Benzen için % 1 v/v ) 0.45 µm por çaplı selüloz nitrat membran filtreden (Millipore) geçirilerek ilave edilmiştir. Bu şekilde hazırlanan biyodegradasyon ortamına, *Pseudomonas* kültürlerinden % 2 (v/v) olacak şekilde eklenmiştir. İki farklı kontrol hazırlanmıştır. Bu kontrollerden birisi MSM

besi ortamı+bakteri diğeri ise MSM+organik kirletici şeklindedir. Bu ortamlar, çalkalamalı olarak 100 rpm’ de 37 °C sıcaklıkta farklı inkübasyon sürelerinde (24, 48, 72 ve 96 saat) inkübe edilmiştir.

Araştırmada kullanılan organik bileşiklerin karbon ve enerji kaynağı olarak kullanılıp kullanılmadığı, ortamdaki *Pseudomonas* suşlarının zamana göre (24, 48 72 ve 96 saat) artışı ile spektrofotometrik (600 nm) olarak belirlenmiştir. Bu amaçla en yüksek degradasyonu yapan suş tespit edilmiştir.

### **3.2.9. *Pseudomonas* spp. suşlarının organik kirleticileri biyodegradasyonu esnasında elde edilen piyosiyanın, EPS ve ramnolipid üretimlerinin tespiti**

Araştırmada kullanılan bakterilerin biyodegradasyon esnasında bazı metabolit (Piyosiyanın, EPS ve Ramnolipid) üretme yeteneklerinin belirlenmesinde Mineral Salt Media (MSM) besi ortamı kullanılmıştır [110].

*Pseudomonas* spp. suşlarının organik kirleticileri biyodegradasyonu esnasında ürettikleri piyosiyanın, EPS ve ramnolipid miktarlarının belirlenmesi MSM besi ortamında bölüm 3.2.3-3.2.5’ de anlatıldığı gibi yapılmıştır.

### **3.2.10. Minimal besi ortamında organik kirleticilerin biyodegradasyonu High-Performance Liquid Kromatografisi (HPLC) analizi ile belirlenmesi**

Bölüm 3.2.8 ve 3.2.9’ da belirtildiği gibi seçilen *Pseudomonas* spp. suşlarının ortamdaki organik bileşikleri karbon kaynağı olarak kullanıp kullanmadığı, belli zaman aralıklarında (24, 48, 72 ve 96. saat) bu bileşiklerin miktarlarındaki değişim ile HPLC analizi yapılarak belirlenmiştir.

Biyodegradasyon ortamlarından 1’ er mL’lik örnek HPLC için hazırlanmıştır. 1 mL’ lik örnek ependorflara konularak 5000 rpm’de 10 dakika çevrilmiştir. Bu şekilde biyodegradasyon ortamı içindeki bakteriler çöktürülmüş ve süpernatant kısmı

ayrılmıştır. Süpernatant kısmı temiz bir ependorfa alınıp bu örnekler HPLC'deki analizine kadar -20°C de saklanmıştır [120].

HPLC analizleri ODTÜ Merkez Laboratuvarı Moleküler Biyoloji ve Biyoteknoloji AR-GE biriminde yapılmıştır. Analizler Varian ProStar model HPLC' de yapılmıştır. Microsorb-MV 100 C18 (150 x 4.6 mm, 5 µm) (R0086200D5) tipinde kolon kullanılmıştır. Mobil faz, % 40 0,75 mM fosforik asit (pH 2,0) ve % 60 metanol' den oluşmuştur. Akım hızı 1,5 mL/dakika ve absorbands 210 nm' de okunmuştur. Örnekler UV/visible tipinde detektör kullanılarak analiz edilmiştir. Analiz için gerekli olan standartların HPLC' ye belli miktarlarda saf konsantrasyon serileri verilerek, standart konsantrasyon doğruları elde edilmiştir.

### **3.2.11. Minimal besiyortamında organik kirleticilerin biyodegradasyonunda *Pseudomonas* spp. suşlarının ürettikleri EPS' nin monomer yapısının High-Performance Liquid Kromatografisi (HPLC) analizi ile belirlenmesi**

Bölüm 3.2.8 ve 3.2.9' da belirtildiği gibi seçilen *Pseudomonas* spp. suşlarının ortamdaki organik bileşikleri karbon kaynağı olarak kullanıp ürettikleri EPS' nin monomer yapısı HPLC analizi yapılarak belirlenmiştir.

Biyodegradasyon ortamlarından suşların EPS üretimi için 1' er mL'lik örnek alınarak Bölüm 3.2.4' de (fenol sülfürik asit aşaması hariç) anlatıldığı gibi HPLC için hazırlanmıştır. Bu örnekler HPLC'deki analizine kadar -20°C de saklanmıştır.

Şeker (Glikoz, Ksiloz, Galaktoz, Ramnoz, Mannoz, Arabinoz, Mannitol, Gliserol ve Riboz) analizi ODTÜ Merkez Laboratuvarı Moleküler Biyoloji ve Biyoteknoloji AR-GE biriminde yapılmıştır. Analizler Varian ProStar model HPLC' de yapılmıştır. Carbohydrates Ca (300 x 6,5 mm) (CP28351) tipinde kolon kullanılmıştır. Mobil faz olarak distile su kullanılmıştır. Akış hızı 0,5 mL/dakika ve sıcaklık 80°C' de çalışılmıştır. Absorbans 210 nm' de okunmuştur. Örnekler VARIAN 350 RI tipinde detektör kullanılarak analiz edilmiştir.



Galaktronik asit, Glukronik asit, N-asetil-D-Galaktoz amin, N-asetil-D-Glukoz aminler için analiz şartları ise; Varian ProStar model HPLC' de, MetaCarb 87H (300 x 7,8 mm) (5210) tipinde kolon kullanılmıştır. Mobil faz olarak 0,008 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> kullanılmıştır. Akış hızı 0,5 mL/dakika ve sıcaklık 35°C' de çalışılmıştır. Örnekler VARIAN 350 RI tipinde detektör kullanılarak analiz edilmiştir. Absorbans 210 nm' de okunmuştur.

Analizler için gerekli olan standartların HPLC' ye belli miktarlarda saf konsantrasyon serileri verilerek, standart konsantrasyon doğruları elde edilmiştir.

## 4. DENEYSEL BULGULAR

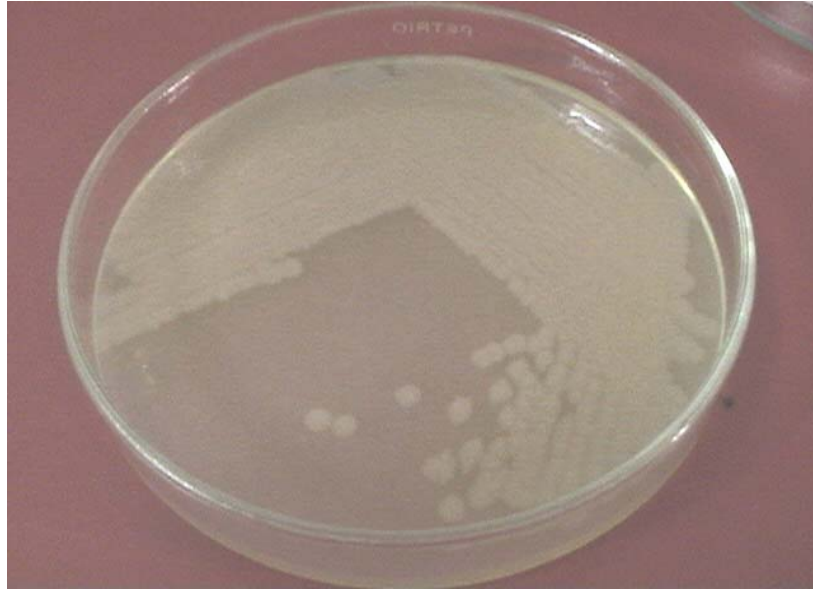
### 4.1. *Pseudomonas* Cinsine Ait Türlerde Pigmentasyon

#### 4.1.1. Farklı besiortamlarında geliştirilen *Pseudomonas* spp. suşlarının pigmentasyonu

Bu araştırmada 20 adet *Pseudomonas* spp. suşu kullanılmıştır. Denenen 6 farklı besiortamında (Pseudomonas Agar Gliserollü, Pseudomonas Agar, King's B, Muller Hinton Agar, Pseudomonas Agar- P, Pseudomonas Agar Base CN Selective Supplement) 20 adet *Pseudomonas* spp. suşlarının pigment oluşturma düzeylerinde farklılıklar gözlenmiştir (Resim 4.1- 4.2). Suşların pigment oluşumunu belirlemek için kullanılan 6 farklı besiortamı içinde pigmentasyon en iyi olarak Pseudomonas Agar Base CN Supplement besiortamında gözlenmiştir (Çizelge 4.1). Sonuçları bu besiortamına göre değerlendirdiğimizde çalışmada kullanılan 6 *Pseudomonas aeruginosa*'nın sadece biri hariç (B16 suşu) hepsinin yüksek düzeyde mavi-yeşil pigment oluşturduğu belirlenmiştir. 4 *Pseudomonas fluorescens* suşundan 3'ü yüksek düzeyde (B4, B5, B6), biri zayıf olmak üzere (B7) sarı-yeşil pigment oluştururken, *Pseudomonas cepecia* (B13, B14) suşlarında sarı-yeşil pigment oluşturmuştur. *Pseudomonas putida* (B12, B15, B18), *Pseudomonas luteola* (B17) ve *Pseudomonas stutzeri* (B8, B9, B10, B11) suşlarında ise sarımsıtrak koloni göstererek katı besiortamı içerisine difüz eden bir renk oluşumu gözlenmemiştir. Pigment oluşturan *P. aeruginosa* B20 ve pigment oluşturmayan *P. stutzeri* B8 suşlarının plaklardaki koloni morfolojisi Resim 4.1 ve 4.2' de verilmiştir.



Resim 4.1. *Pseudomonas aeruginosa* B20 (+++) suşunun Pseudomonas Agar Base CN supplement besiyortamında ki pigmentasyonu



Resim 4.2. *Pseudomonas stutzeri* B8 (-) suşunun Pseudomonas Agar Base CN supplement besiyortamında ki pigmentasyonu

Çizelge 4.1. Farklı besiortamlarında geliştirilen *Pseudomonas* spp. suşlarının pigment oluşumları

SUŞLAR	Pseudomonas Agar Gliserollü (PGA)	Pseudomonas Agar (PA)	King's B	Muller Hinton Agar	Pseudomonas Agar- P	Pseudomonas Agar Base CN Selective Supplement	Besiyerinde oluşturdukları pigment renkleri	Muhtemel tanımlanan pigment tipleri
<i>P. aeruginosa</i> B1	++	+	++	++	++	+++	Mavi-Yeşil	Piyosiyanin
<i>P. aeruginosa</i> B2	++	-	++	++	++	+++	Mavi-Yeşil	Piyosiyanin
<i>P. aeruginosa</i> B3	++	+	++	++	++	+++	Mavi-Yeşil	Piyosiyanin
<i>P. aeruginosa</i> B16	-	-	-	-	-	+	Mavi-Yeşil	Piyosiyanin
<i>P. aeruginosa</i> B19	++	+	++	++	++	+++	Mavi-Yeşil	Piyosiyanin
<i>P. aeruginosa</i> B20	++	+	++	++	++	+++	Mavi-Yeşil	Piyosiyanin
<i>P. fluorescens</i> B4	++	+	++	++	++	+++	Sarı-Yeşil	Fluorescens
<i>P. fluorescens</i> B5	++	+	++	++	++	+++	Sarı-Yeşil	Fluorescens
<i>P. fluorescens</i> B6	-	-	+	+	++	+++	Sarı-Yeşil	Fluorescens
<i>P. fluorescens</i> B7	-	-	+	+	+	+	Sarı-Yeşil	Fluorescens
<i>P. stutzeri</i> B8	-	-	-	-	-	-	Sarımtırak	-
<i>P. stutzeri</i> B9	-	-	-	-	-	-	Sarımtırak	-
<i>P. stutzeri</i> B10	-	-	-	-	-	-	Sarımtırak	-
<i>P. stutzeri</i> B11	-	-	-	-	-	-	Sarımtırak	-
<i>P. cepacia</i> B13	++	+	++	++	++	+++	Sarı-Yeşil	-
<i>P. cepacia</i> B14	++	+	++	++	++	+++	Sarı-Yeşil	-
<i>P. putida</i> B12	-	-	-	-	-	-	Sarımtırak	-
<i>P. putida</i> B15	-	-	-	-	-	-	Sarımtırak	-
<i>P. putida</i> B18	-	-	-	-	-	-	Sarımtırak	-
<i>P. luteola</i> B17	-	-	-	-	-	-	Sarımtırak	-

+++Yüksek düzeyde pigmentasyon

++orta düzeyde pigmentasyon

+zayıf pigmentasyon

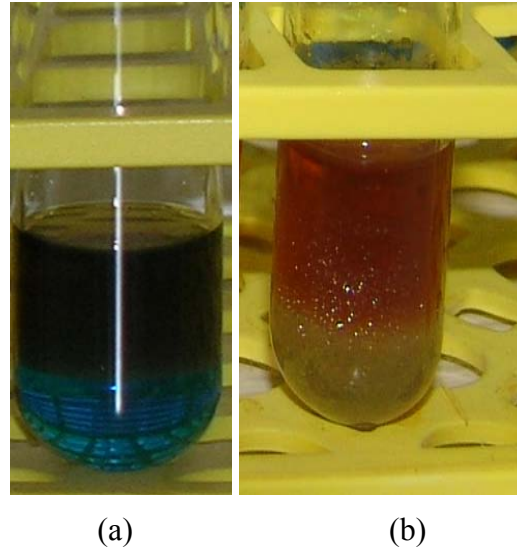
-pigmentasyon gözlenmemiştir

#### 4.1.2. *Pseudomonas aeruginosa* suşlarında piyosiyanin pigmenti üretim miktarları

*P. aeruginosa* suşlarının piyosiyanin pigmenti üretimleri 3.2.3' de anlatıldığı gibi, Nutrient broth (NB) besiortamında  $\mu\text{g/mL}$  olarak belirlenmiş (Çizelge 4.2) ve piyosiyanin üreten suşlarının kloroformda ki mavi renkli bazik eriği ve asit konulunca kırmızı renkli tuz hali Resim 4.3' de gösterilmiştir. Denemelerde kullanılan suşlardan en yüksek piyosiyanin üretim miktarı sırasıyla *P. aeruginosa* B19 (10,10  $\mu\text{g/mL}$ ), *P. aeruginosa* B20 (9,81  $\mu\text{g/mL}$ ), *P. aeruginosa* B1 (6,50  $\mu\text{g/mL}$ ), *P. aeruginosa* B3 (5,86  $\mu\text{g/mL}$ ), *P. aeruginosa* B2 (5,40  $\mu\text{g/mL}$ ), suşlarında bulunurken, en düşük piyosiyanin üretim miktarı ise *P. aeruginosa* B16 (2,11  $\mu\text{g/mL}$ ) suşunda bulunmuştur (Çizelge 4.2). Bu suşların piyosiyanin üretimleri Çizelge 4.1' de verilen kalitatif olarak belirlenen pigment oluşumları ile paralellik göstermiştir. Tabloda zayıf pigmentasyonu (+) olan *P. aeruginosa* B16 suşunun piyosiyanin üretiminin spektrofotometrik yöntemle belirlendiğinde de düşük olduğu aynı şekilde yüksek pigmentasyon (+++) gösteren *P. aeruginosa* B1, B2, B3, B19 ve B20 suşlarının spektrofotometrik olarak belirlenen pigment üretimlerinin de yüksek olduğu tespit edilmiştir.

Çizelge 4.2. *P. aeruginosa* suşlarının piyosiyanin üretimleri

SUŞLAR	PİYOSİYANİN ( $\mu\text{g/mL}$ )
<i>P. aeruginosa</i> B1	6,50±0,02
<i>P. aeruginosa</i> B2	5,40±0,03
<i>P. aeruginosa</i> B3	5,86±0,01
<i>P. aeruginosa</i> B16	2,11±0,05
<b><i>P. aeruginosa</i> B19</b>	<b>10,10±0,01</b>
<i>P. aeruginosa</i> B20	9,81±0,03



Resim 4.3. *P. aeruginosa* B20 suşunun oluşturduğu piyosiyenin pigmentinin (a) kloroformda mavi renkteki bazık eriyi ve (b) üzerine asit konulunca oluşan kırmızı renkli tuz hali görünümü

#### 4.2. *Pseudomonas* spp. Suşlarında EPS Üretim Miktarları

*Pseudomonas* spp. suşlarının EPS üretimleri 3.2.4' de anlatıldığı gibi, Nutrient broth (NB) besiyortamında mg/L olarak belirlenmiş ve sonuçlar Çizelge 4.3. verilmiştir. Denemelerde kullanılan suşlardan en yüksek EPS üretimi *P. aeruginosa* B1 (75 mg/L) suşunda bulunurken, en düşük EPS üretim miktarı *P. aeruginosa* B16 (22 mg/L) suşunda bulunmuştur. İkinci derecede yüksek EPS üretimi *P. stutzeri* B9 (70 mg/L), *P. cepecia* B14 (68 mg/L), *P. fluorescens* B6 (67 mg/L) ve *P. putida* B15 (67 mg/L) suşlarında görülürken düşük EPS üretimi *P. luteola* B17 (31 mg/L), *P. aeruginosa* B2 (34 mg/L), *P. putida* B18 (37 mg/L) olarak belirlenmiştir. Pigment üretimi düşük olan *P. aeruginosa* B16 suşunun (Çizelge 4.2) EPS üretiminin de düşük olduğu gözlenmiştir (Çizelge 4.3).

Çizelge 4.3. Bazı *Pseudomonas* spp. suşlarının EPS üretimleri

SUŞLAR	EPS (mg/L)
<b><i>P. aeruginosa</i> B1</b>	<b>75±1,0</b>
<i>P. aeruginosa</i> B2	34±4,0
<i>P. aeruginosa</i> B3	60±2,0
<i>P. aeruginosa</i> B16	22±0,0
<i>P. aeruginosa</i> B19	58±0,0
<i>P. aeruginosa</i> B20	44±0,0
<i>P. fluorescens</i> B4	53±0,0
<i>P. fluorescens</i> B5	63±0,0
<b><i>P. fluorescens</i> B6</b>	<b>67±2,0</b>
<i>P. fluorescens</i> B7	45±3,0
<i>P. stutzeri</i> B8	63±5,0
<b><i>P. stutzeri</i> B9</b>	<b>70±1,0</b>
<i>P. stutzeri</i> B10	52±1,0
<i>P. stutzeri</i> B11	41±2,0
<i>P. cepacia</i> B13	65±0,0
<b><i>P. cepacia</i> B14</b>	<b>68±1,0</b>
<i>P. putida</i> B12	55±0,0
<b><i>P. putida</i> B15</b>	<b>67±5,0</b>
<i>P. putida</i> B18	37±0,0
<i>P. luteola</i> B17	31±0,0

### 4.3. *Pseudomonas* spp. Suşlarında Ramnolipid Üretim Miktarı

*Pseudomonas* spp. suşlarının ramnolipid üretimleri 3.2.5' de anlatıldığı gibi, Nutrient Broth (NB) besiortamında belirlenmiş ve sonuçlar Çizelge 4.4.' de verilmiştir. Yapılan ölçümler sonrası *Pseudomonas* spp. suşlarının ramnolipid üretim miktarları 521-219 mg/L arasında tespit edilmiştir. En yüksek miktarda ramnolipid üretimi *P. aeruginosa* B19 (521 mg/L), *P. cepecia* B13 (474 mg/L), *P. aeruginosa* B20 (467 mg/L), *P. aeruginosa* B3 (452 mg/L), *P. aeruginosa* B14 (427 mg/L) suşlarında bulunurken, en düşük ramnolipid üretim miktarı ise *P. stutzeri* B10 (219 g/L), *P. stutzeri* B9 (257 mg/L), *P. stutzeri* B11 (263 mg/L) ve *P. stutzeri* B8 (298 mg/L) suşlarında bulunmuştur. *P. aeruginosa* B19 suşunda hem ramnolipid üretiminin hem de piyosiyenin üretiminin yüksek olduğu belirlenmiştir. Piyosiyenin üretimi yüksek olan diğer *P. aeruginosa* (B1, B2, B3, B20) suşlarının ramnolipid üretimleri arasında da benzer ilişkinin olduğu dikkati çekmiştir. Pigment oluşturan *Pseudomonas aeruginosa* suşları dışındaki suşların (*P. fluorescens* B4, B5, B6, B7, *P. cepecia* B13, B14, *P. putida* B12, B15, B18 ve *P. luteola* B17) genellikle ramnolipid üretimlerinin de yüksek olduğu, pigment oluşturmayan (*P. stutzeri* B8, B9, B11 ve B12) suşlarının ise ramnolipid üretim miktarlarının düşük olduğu gözlenmiştir. En yüksek ramnolipid üreten suşların genelde piyosiyenin üreten *P. aeruginosa* türlerine ait suşlar arasından olduğu tespit edilmiştir.



Çizelge 4.4. Bazı *Pseudomonas* spp. suşlarının ramnolipid üretimleri

SUŞLAR	Ramnolipid (mg/L)
<i>P. aeruginosa</i> B1	388±0,3
<i>P. aeruginosa</i> B2	385±0,1
<i>P. aeruginosa</i> B3	452±0,5
<i>P. aeruginosa</i> B16	347±0,0
<b><i>P. aeruginosa</i> B19</b>	<b>521±0,3</b>
<i>P. aeruginosa</i> B20	467±0,2
<i>P. fluorescens</i> B4	334±0,0
<i>P. fluorescens</i> B5	339±0,2
<i>P. fluorescens</i> B6	337±0,4
<i>P. fluorescens</i> B7	339±0,2
<i>P. stutzeri</i> B8	298±0,2
<i>P. stutzeri</i> B9	257±0,3
<i>P. stutzeri</i> B10	219±0,4
<i>P. stutzeri</i> B11	263±0,1
<i>P. cepacia</i> B13	474±0,0
<i>P. cepacia</i> B14	427±0,2
<i>P. putida</i> B12	320±0,2
<i>P. putida</i> B15	327±0,1
<i>P. putida</i> B18	336±0,0
<i>P. luteola</i> B17	361±0,0

#### 4.4. *Pseudomonas aeruginosa* Suşlarının Piyosiyanın Üretimi Ve Ramnolipid Üretimi Arasındaki İlişkinin İstatiksel Olarak Belirlenmesi

*P. aeruginosa* suşlarının piyosiyanın üretimi ve ramnolipid üretimi arasındaki ilişki 3.2.6' da anlatıldığı gibi Pearson's korelasyonuna göre belirlenmiş ve sonuçlar Çizelge 4.5' de verilmiştir. Bu sonuçlara göre *P. aeruginosa* (B1, B2, B3, B16, B19, B20) suşlarının piyosiyanın üretimi ve ramnolipid üretimi arasında pozitif bir korelasyon ( $\rho=0,823$ ) olduğu tespit edilmiştir. Anlamlılık ise,  $\alpha= 0.05$  düzeyinde bulunmuştur.

Çizelge 4.5. *P. aeruginosa* suşlarının piyosiyanın üretimi ve ramnolipid üretimi arasındaki ilişki

		Piyosiyanın	Ramnolipid
Piyosiyanın	Pearson Correlation	1	.823
	Sig. (2-tailed)	.	.044
	N	6	6
Ramonolipid	Pearson Correlation	.823	1
	Sig. (2-tailed)	.044	.
	N	6	6

\*Korelasyon 0.05 düzeyinde anlamlıdır (2-tailed).

#### 4.5. 2,4-D, Benzin, BTX ve Benzen' in *Pseudomonas* spp. Suşlarına Minimum İnhibitör Konsantrasyonunun (MİK) Belirlenmesi

2,4-D, Benzin, BTX ve Benzen' in *Pseudomonas* spp. suşlarına NB besi ortamında ki Minimum İnhibitör Konsantrasyonu (MİK) denemeleri 3.2.6' da anlatıldığı gibi yapılmıştır. Farklı konsantrasyonlarda ki 2,4-D (50-1000 mg/mL), benzin, BTX ve benzenin (% 0,5-5 v/v) denemelerde kullanılan suşlar üzerine olan minimum inhibisyon etkisi Çizelge 4.6' de gösterilmiştir.

Bu çalışmada elde edilen sonuçlara göre tüm suşlar üzerinde 2,4-D' nin inhibitörük etkisinin olmadığı ancak denenen en yüksek konsantrasyonda (1000 mg/mL) *P. fluorescens* B6, *P. stutzeri* B8 ve B11 suşlarında minimum inhibisyon belirlendiği için bu suşların diğer suşlara göre 2,4-D' ye daha duyarlı olduğu söylenebilir.

Benzin ise *P. aeruginosa* B1, B2, B19, *P. stutzeri* B10, B11 ve *P. putida* B12 suşlarında farklı konsantrasyonlarda MİK belirlenirken diğer suşların hepsinin denenen en yüksek konsantrasyonda dahi MİK belirlenemediği ve bu suşlara benzinin inhibitörük etkisinin olmadığı tespit edilmiştir.

BTX' de ise *P. aeruginosa* B16 ve *P. putida* B15 suşları denenen konsantrasyonların hepsine direnç gösterirken diğer suşların MİK değerleri farklı farklı konsantrasyonlarda belirlenmiştir. *P. stutzeri* B8 suşunun gelişimi % 2' lik konsantrasyonda ki BTX' de inhibe olduğundan ve bu çalışmada belirlenen en düşük MİK' i gösterdiğinden bu suşun BTX' e daha duyarlı olduğu söylenebilir.

% 4' lük benzenin sadece *P. stutzeri* B9 suşu üzerine minimum inhibisyon etkisi gösterdiği, diğer suşların hepsinin denenen en yüksek konsantrasyonda (% 5 v/v) bile inhibe olmadığı belirlenmiştir. Bu sonuçlara göre denemelerde kullanılan 20 adet *Pseudomonas* cinsine ait türlerin 2,4-D ve benzene, benzin ve BTX' e göre daha dirençli olduğu bulunmuştur (Çizelge 4.6). Aynı zamanda *Pseudomonas* spp. suşlarının minimal besiortamında organik bileşikleri degradasyonunun da kullanılacak olan konsantrasyonlar MİK' e göre belirlenmiş ve bu konsantrasyonlar arasında da suşların geliştiği en uygun konsantrasyonlar 2,4-D için 50 mg/L, benzin için % 2 v/v, BTX ve benzen için % 1 v/v olarak tespit edilmiştir. Bundan sonraki çalışmalarda bu konsantrasyon esas alınarak yürütülmüştür.

Çizelge 4.6. Farklı konsantrasyonlardaki 2,4-D, benzin, BTX ve benzenin *Pseudomonas* spp. suşlarına olan minimum inhibisyon konsantrasyonu (MİK) değerleri

SUŞLAR	2,4-D	BENZİN	BTX	BENZEN
	MİK (50-1000 mg/mL)	MİK % 0,5-5,0 (v/v)	MİK % 0,5-5,0 (v/v)	MİK % 0,5-5,0 (v/v)
<i>P. aeruginosa</i> B1	*	4	3	**
<i>P. aeruginosa</i> B2	*	2	3	**
<i>P. aeruginosa</i> B3	*	**	3	**
<i>P. aeruginosa</i> B16	*	**	**	**
<i>P. aeruginosa</i> B19	*	5	4	**
<i>P. aeruginosa</i> B20	*	**	4	**
<i>P. fluorescens</i> B4	*	**	5	**
<i>P. fluorescens</i> B5	*	**	3	**
<i>P. fluorescens</i> B6	1000	**	3	**
<i>P. fluorescens</i> B7	*	**	5	**
<i>P. stutzeri</i> B8	1000	**	2	**
<i>P. stutzeri</i> B9	*	**	3	4
<i>P. stutzeri</i> B10	*	2	3	**
<i>P. stutzeri</i> B11	1000	2	3	**
<i>P. cepecia</i> B13	*	**	5	**
<i>P. cepecia</i> B14	*	**	5	**
<i>P. putida</i> B12	*	3	3	**
<i>P. putida</i> B15	*	**	**	**
<i>P. putida</i> B18	*	**	4	**
<i>P. luteola</i> B17	*	**	5	**

\*1000 ppm üzeri dirençli

\*\*% 5 (v/v) üzeri dirençli

#### 4.6. Minimal Besiortamında *Pseudomonas* spp. Suşlarının Organik Kirleticileri Biyodegradasyonu

Minimal besiortamına karbon kaynağı olarak organik kirleticilerin ilavesi ile *Pseudomonas* spp. suşlarının gelişimlerinin belirlenerek, bu organik kirleticileri karbon kaynağı olarak kullanım düzeyleri tespit edilmiştir. Denemelerde kullanılan suşların 50 mg/L 2,4-D, % 1 v/v benzen ve BTX, % 2 v/v benzinde minimal besiortamında belli zaman aralıklarında (24, 48, 72 ve 96. saatlerde) ki bakteri gelişimleri spektrofotometrik olarak belirlenmiş ve sonuçlar Çizelge 4.7-4.8' de verilmiştir.

Bu sonuçlara göre *Pseudomonas* spp. suşlarının karbon kaynağı olmayan minimal besiortamında 50 mg/mL 2,4-D herbisitini 24. saatten itibaren karbon kaynağı olarak kullanıp gelişim gösterdikleri ve en iyi gelişimin 72. saatte gerçekleştiği bulunmuştur. Minimal besiortamında 50 mg/mL 2,4-D herbisitini karbon kaynağı olarak kullanıp 72. saatte en iyi gelişimi gösteren suşlar ise sırasıyla *P. aeruginosa* B1 (0,19), *P. fluorescens* B5 (0,15), *P. stutzeri* B11 (0,14), *P. aeruginosa* B20 (0,14), *P. stutzeri* B8 (0,12), *P. stutzeri* B10 (0,12), *P. putida* B12 (0,12) ve *P. aeruginosa* B3 (0,10), olarak tespit edilmiştir (Çizelge 4.7). 72. saatten sonra gelişimin fazla olmaması suşların karbon kaynağı olarak 2,4-D' yi 72. saate kadar parçaladığını göstermektedir.

Minimal besiortamına karbon kaynağı olarak % 1 (v/v)' lik benzen ilave edildiği zaman *Pseudomonas* spp. suşlarının gelişimleri, 50 mg/mL 2,4-D herbisitine göre daha yavaş ve az olduğu tespit edilmiştir. % 1 (v/v)' lik benzende bazı suşlar 48. saatte en iyi gelişim gösterebilir, benzeni iyi kullanan ve diğer suşlara göre daha iyi gelişim gösteren suşların (*P. fluorescens* B4, B5, B6, B7, *P. luteola* B17, *P. cepecia* B13) genellikle 72. saate kadar iyi geliştiği 96. saatte gelişimin durduğu belirlenmiştir. 72. saatte en iyi gelişen bakterilerin yoğunlukları *P. fluorescens* B5 (0,10), *P. luteola* B17 (0,08), *P. fluorescens* B4 (0,08) ve *P. fluorescens* B6 (0,07) olarak belirlenirken, karbon kaynağı olmayan sadece MSM besiortamında aynı şartlarda bakterilerde hiçbir gelişme olmadığı belirlenmiştir.

*Pseudomonas* spp. suşlarının %1 (v/v)' lik BTX' deki gelişimin genel olarak 2,4-D herbisitine göre daha az, benzindeki bakteriyal gelişime kıyasla daha fazla olduğu ve en iyi gelişimin 48. saatte gerçekleştiği tespit edilmiştir. Bu suşlardan 48. saatte en iyi gelişimi sırasıyla *P. stutzeri* B11 (0,14), *P. stutzeri* B8 (0,11), *P. fluorescens* B5 (0,10) ve *P. aeruginosa* B3 (0,09) suşları göstermiştir (Çizelge 4.8).

*Pseudomonas* spp. suşlarının karbon kaynağı olarak % 2 (v/v)' lik benzinde, diğer organik bileşiklere kıyasla daha az ve yavaş geliştiği tespit edilmiştir. Yapılan denemelerde bakteri gelişimin 96. saatte olduğu fakat 96. saat sonrasında bakteri gelişiminin durduğu belirlenmiş ve 96. saat sonrasındaki ölçüm sonuçları dikkate alınmamıştır. Bu suşlar arasında 96. saatte en iyi gelişimi sırasıyla *P. aeruginosa* B3 (0,06) ve *P. putida* B15 (0,06) suşları göstermiştir (Çizelge 4.8).

Denemelerde kullanılan *Pseudomonas* spp. suşlarının genel olarak sırasıyla en iyi 2,4-D herbisitinde ve BTX' de geliştikleri için bu organik bileşikleri benzen ve benzene göre daha fazla degrede ettikleri söylenebilir.

Çizelge 4.7. *Pseudomonas* spp. suşlarının 50 mg/mL 2,4-D ve % 1' lik benzende belli zaman aralıklarındaki (24, 48, 72 ve 96. saatlerdeki) bakteri gelişimi

Bakteri Türleri	Suş No	NB Kontrol	MSM 2,4-D Kontrol	MSM Benzen Kontrol	Optik Yoğunluk 600 nm							
					50 mg/mL 2,4-D' deki bakteri gelişimi				% 1 (v/v) Benzen' deki bakteri gelişimi			
					24. saat	48. saat	72. saat	96. saat	24. saat	48. saat	72. saat	96. saat
<i>P. aeruginosa</i>	B1	1,58±0,01	-	-	<b>0,19±0,00</b>	<b>0,19±0,00</b>	<b>0,19±0,00</b>	<b>0,18±0,00</b>	0,02±0,00	0,04±0,00	0,04±0,00	0,03±0,00
	B2	1,17±0,03	-	-	0,04±0,00	0,04±0,00	0,05±0,00	0,05±0,00	0,01±0,00	0,05±0,00	0,05±0,00	0,04±0,00
	B3	1,53±0,02	-	-	<b>0,06±0,00</b>	<b>0,06±0,00</b>	<b>0,10±0,00</b>	<b>0,10±0,00</b>	<b>0,02±0,00</b>	<b>0,06±0,00</b>	<b>0,06±0,00</b>	<b>0,05±0,00</b>
	B16	1,44±0,04	-	-	0,06±0,00	0,06±0,00	0,07±0,00	0,07±0,00	0,01±0,00	0,04±0,00	0,03±0,00	0,03±0,00
	B19	1,23±0,04	-	-	0,06±0,00	0,07±0,00	0,07±0,00	0,07±0,00	0,01±0,00	0,01±0,00	0,01±0,00	0,01±0,00
	B20	1,09±0,01	-	-	<b>0,13±0,01</b>	<b>0,13±0,00</b>	<b>0,14±0,00</b>	<b>0,13±0,00</b>	0,01±0,00	0,02±0,00	0,02±0,00	0,01±0,00
<i>P. fluorescens</i>	B4	1,73±0,01	-	-	0,07±0,01	0,08±0,00	0,08±0,00	0,08±0,00	<b>0,03±0,00</b>	<b>0,07±0,00</b>	<b>0,08±0,00</b>	<b>0,08±0,00</b>
	B5	1,70±0,01	-	-	<b>0,14±0,01</b>	<b>0,15±0,00</b>	<b>0,15±0,01</b>	<b>0,15±0,00</b>	<b>0,03±0,00</b>	<b>0,09±0,00</b>	<b>0,10±0,00</b>	<b>0,09±0,00</b>
	B6	1,91±0,03	0,01±0,00	-	0,07±0,01	0,07±0,00	0,07±0,01	0,07±0,00	0,01±0,00	0,05±0,00	0,07±0,00	0,07±0,00
	B7	1,59±0,03	-	-	0,04±0,0	0,04±0,01	0,05±0,01	0,05±0,00	0,02±0,00	0,06±0,00	0,06±0,00	0,06±0,00
<i>P. stutzeri</i>	B8	1,68±0,04	-	-	<b>0,09±0,00</b>	<b>0,11±0,00</b>	<b>0,12±0,00</b>	<b>0,12±0,00</b>	0,01±0,00	0,01±0,00	0,01±0,00	0,01±0,00
	B9	1,78±0,04	-	-	0,05±0,00	0,05±0,00	0,06±0,00	0,06±0,00	0,01±0,00	0,01±0,00	0,02±0,00	0,02±0,00
	B10	0,82±0,02	-	-	<b>0,09±0,00</b>	<b>0,09±0,00</b>	<b>0,12±0,01</b>	<b>0,12±0,00</b>	0,03±0,00	0,03±0,00	0,05±0,00	0,05±0,00
	B11	1,71±0,02	0,01±0,00	-	<b>0,10±0,00</b>	<b>0,12±0,00</b>	<b>0,14±0,00</b>	<b>0,14±0,00</b>	0,02±0,00	0,05±0,00	0,06±0,00	0,06±0,00
<i>P. putida</i>	B12	1,77±0,05	-	-	<b>0,10±0,00</b>	<b>0,10±0,00</b>	<b>0,12±0,00</b>	<b>0,12±0,00</b>	0,02±0,00	0,05±0,00	0,05±0,00	0,05±0,00
	B15	1,49±0,03	-	-	0,08±0,00	0,08±0,00	0,08±0,00	0,08±0,00	0,01±0,00	0,04±0,00	0,05±0,00	0,05±0,00
	B18	2,16±0,05	-	-	0,06±0,00	0,06±0,00	0,06±0,00	0,06±0,00	0,01±0,00	0,03±0,00	0,04±0,00	0,04±0,00
<i>P. cepecia</i>	B13	2,17±0,02	0,01±0,00	0,01±0,00	0,07±0,00	0,07±0,00	0,09±0,00	0,09±0,00	0,03±0,00	0,03±0,00	0,06±0,00	0,06±0,00
	B14	1,66±0,01	-	0,01±0,00	0,07±0,00	0,08±0,00	0,08±0,00	0,08±0,00	0,02±0,00	0,03±0,00	0,05±0,00	0,05±0,00
<i>P. luteola</i>	B17	1,87±0,03	-	-	0,04±0,00	0,06±0,00	0,06±0,00	0,06±0,00	<b>0,01±0,00</b>	<b>0,07±0,00</b>	<b>0,08±0,00</b>	<b>0,08±0,00</b>

-: Bakteri gelişimi belirlenmemiştir.

Çizelge 4.8. *Pseudomonas* spp. suşlarının %1' lik BTX ve % 2'lik benzinde belli zaman aralıklarındaki (24, 48, 72 ve 96. saatlerdeki) bakteri gelişimi

Bakteri Türleri	Suş No	NB Kontrol	MSM BTX Kontrol	MSM Benzin Kontrol	Optik Yoğunluk 600 nm							
					%1 (v/v) BTX' deki bakteri gelişimi				% 2 (v/v) Benzindeki bakteri gelişimi			
					24. saat	48. saat	72. saat	96. saat	24. saat	48. saat	72. saat	96. saat
<i>P. aeruginosa</i>	B1	1,58±0,01	-	-	0,02±0,00	0,08±0,00	0,07±0,00	0,07±0,00	0,01±0,00	0,01±0,00	0,02±0,00	0,02±0,00
	B2	1,17±0,03	-	-	0,01±0,00	0,05±0,00	0,05±0,00	0,05±0,00	0,01±0,00	0,01±0,00	0,03±0,00	0,04±0,00
	B3	1,53±0,02	-	-	<b>0,05±0,00</b>	<b>0,10±0,00</b>	<b>0,09±0,00</b>	<b>0,09±0,00</b>	<b>0,01±0,00</b>	<b>0,02±0,00</b>	<b>0,05±0,00</b>	<b>0,06±0,00</b>
	B16	1,44±0,04	-	-	0,01±0,00	0,05±0,00	0,04±0,00	0,04±0,00	0,01±0,00	0,01±0,00	0,04±0,00	0,04±0,00
	B19	1,23±0,04	-	-	0,01±0,00	0,02±0,00	0,02±0,00	0,02±0,00	0,01±0,00	0,01±0,00	0,02±0,00	0,03±0,00
	B20	1,09±0,01	-	-	0,01±0,00	0,02±0,00	0,02±0,00	0,02±0,00	0,01±0,00	0,01±0,00	0,01±0,00	0,02±0,00
<i>P. fluorescens</i>	B4	1,73±0,01	-	-	0,02±0,00	0,08±0,00	0,07±0,00	0,06±0,00	0,01±0,00	0,01±0,00	0,02±0,00	0,02±0,00
	B5	1,70±0,01	-	-	<b>0,02±0,00</b>	<b>0,10±0,00</b>	<b>0,09±0,00</b>	<b>0,09±0,00</b>	0,01±0,00	0,01±0,00	0,01±0,00	0,02±0,00
	B6	1,91±0,03	-	-	0,04±0,00	0,05±0,00	0,04±0,00	0,04±0,00	0,01±0,00	0,01±0,00	0,01±0,00	0,02±0,00
	B7	1,59±0,03	-	-	0,02±0,00	0,07±0,00	0,06±0,00	0,06±0,00	0,01±0,00	0,01±0,00	0,02±0,00	0,03±0,00
<i>P. stutzeri</i>	B8	1,68±0,04	-	-	<b>0,08±0,00</b>	<b>0,11±0,00</b>	<b>0,10±0,00</b>	<b>0,09±0,00</b>	0,01±0,00	0,01±0,00	0,01±0,00	0,01±0,00
	B9	1,78±0,04	-	-	0,01±0,00	0,02±0,00	0,02±0,00	0,02±0,00	0,02±0,00	0,02±0,00	0,03±0,00	0,03±0,00
	B10	0,82±0,02	-	-	0,04±0,00	0,08±0,00	0,08±0,00	0,07±0,00	0,03±0,00	0,03±0,00	0,04±0,00	0,04±0,00
	B11	1,71±0,02	-	-	<b>0,12±0,00</b>	<b>0,14±0,00</b>	<b>0,13±0,00</b>	<b>0,11±0,00</b>	0,01±0,00	0,03±0,00	0,03±0,00	0,04±0,00
<i>P. putida</i>	B12	1,77±0,05	-	-	0,02±0,00	0,06±0,00	0,05±0,00	0,04±0,00	0,01±0,00	0,02±0,00	0,02±0,00	0,03±0,00
	B15	1,49±0,03	-	-	0,02±0,00	0,04±0,00	0,04±0,00	0,03±0,00	<b>0,02±0,00</b>	<b>0,02±0,00</b>	<b>0,05±0,00</b>	<b>0,06±0,00</b>
	B18	2,16±0,05	-	-	0,02±0,00	0,03±0,00	0,03±0,00	0,03±0,00	0,03±0,00	0,03±0,00	0,03±0,00	0,03±0,00
<i>P. cepecia</i>	B13	2,17±0,02	-	-	0,03±0,00	0,06±0,00	0,06±0,00	0,05±0,00	0,01±0,00	0,01±0,00	0,01±0,00	0,03±0,00
	B14	1,66±0,01	-	-	0,02±0,00	0,05±0,00	0,05±0,00	0,05±0,00	0,01±0,00	0,02±0,00	0,02±0,00	0,03±0,00
<i>P. luteola</i>	B17	1,87±0,03	-	-	0,06±0,00	0,07±0,00	0,07±0,00	0,07±0,00	0,02±0,00	0,02±0,00	0,02±0,00	0,03±0,00

-: Bakteri gelişimi belirlenmemiştir.



#### 4.7. Minimal Besiortamında *Pseudomonas* spp. Suşlarının Organik Kirleticilerde Piyosiyanın Üretimlerinin Belirlenmesi

Minimal besiortamındaki organik kirleticileri karbon kaynağı olarak kullanan *Pseudomonas* spp. suşlarının belli zaman aralıklarında biyodegradasyonu esnasında piyosiyanın üretimi 3.2.3' da anlatıldığı gibi yapılmış ve sonuçlar Çizelge 4.9, 4.10' da verilmiştir.

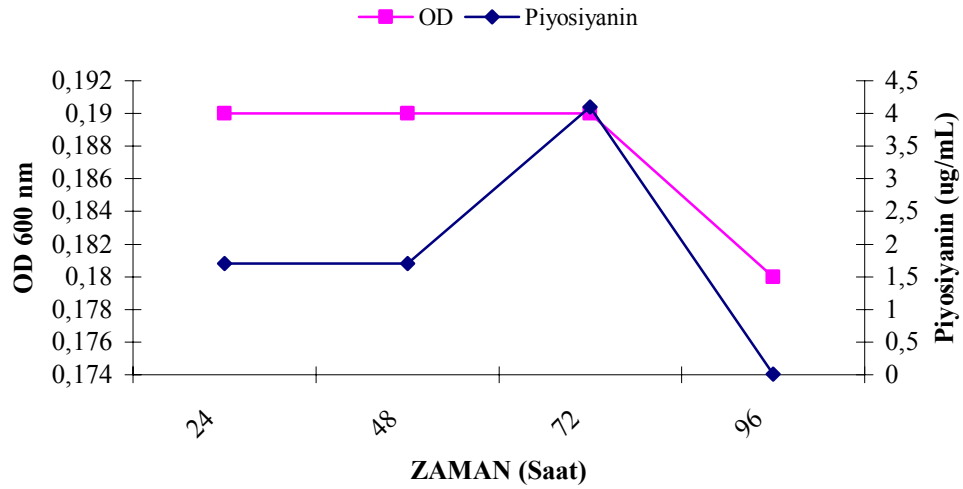
Bu sonuçlara göre minimal besiortamında 50 mg/mL 2,4-D herbisitini karbon kaynağı olarak kullanan *P. aeruginosa* suşları en iyi pigment üretimini 72. saatte gerçekleştirmiş ve en iyi pigment üretiminde sırasıyla *P. aeruginosa* B1 (4,1 µg/mL) ve *P. aeruginosa* B20 (3,8 µg/mL) suşlarında belirlenmiştir. *P. aeruginosa* (B1, B2, B3, B16, B19, B20) suşları 2,4-D herbisitinde en iyi gelişimi 72. saatte gösterirken (Çizelge 4.7) en iyi piyosiyanın üretimini de 72. saatte göstermiştir (Çizelge 4.9).

Aynı şekilde *P. aeruginosa* suşlarından % 1' lik benzen ve BTX' de en iyi piyosiyanın üretiminin 48. saatte *P. aeruginosa* B3 suşu tarafından olduğu tespit edilmiştir. Bu suş % 1' lik benzende 1,3 µg/mL piyosiyanın üretirken, % 1' lik BTX' de de buna yakın bir değerde 1,2 µg/mL piyosiyanın üretmiştir. Yine 48. saatte BTX' i karbon kaynağı olarak kullanarak 2. derecede yüksek piyosiyanın üretimi *P. aeruginosa* B19 (1,1 µg/mL) suşunda tespit edilmiştir. *P. aeruginosa* suşlarının benzen ve BTX' deki piyosiyanın üretimlerinin 2,4-D herbisitindeki piyosiyanın üretimlerinden daha düşük olduğu belirlenmiştir(Çizelge 4.9, 4.10).

% 2' lik benzinde de benzer şekilde en iyi piyosiyanın üretimi 96. saatte *P. aeruginosa* B3 suşu tarafından (0,8 µg/mL) gerçekleşmiş ve *P. aeruginosa* suşlarının benzindeki piyosiyanın üretimleri için 96. saat sonrasında yapılan ölçümlerde düşüş tespit edildiğinden sonuçlar bu saate kadar verilmiştir. *P. aeruginosa* suşlarının diğer organik bileşiklere göre benzini karbon kaynağı olarak kullandığında daha düşük miktarda piyosiyanın ürettiği belirlenmiştir (Çizelge 4.10).

*P. aeruginosa* (B1, B2, B3, B16, B19, B20) suşlarının genelde 2,4-D herbisitinde 72. saatte (Çizelge 4.7), benzen ve BTX' de 48. saatte (Çizelge 4.7, Çizelge 4.8) ve benzinde 96. saatte (Çizelge 4.8) bakteriyal gelişimin durgun fazına geçtikleri ve bu saatlerde piyosiyanın üretimini gerçekleştirdikleri söylenebilir.

Denemelerde kullanılan *P. aeruginosa* suşlarının organik bileşikleri (2,4-D, benzen, BTX ve benzin) biyodegradasyonu esnasında en iyi bakteri gelişimi ve piyosiyanın üretimi 2,4-D herbisitinin karbon kaynağı olarak kullanımı ile *P. aeruginosa* B1 suşunda görülmüştür. *P. aeruginosa* B1 suşunda bakteri gelişimi ve piyosiyanın üretimi arasındaki ilişki Şekil 4.1' de verilmiştir. *P. aeruginosa* B1 suşunun bakteri gelişiminin durgunluk fazında ve en yüksek oranda piyosiyanın ürettiği, bakteri gelişiminin düşmeye yani bakteride gelişimin durduğu ve ölüm oranının arttığı sürelerde ise piyosiyanın miktarında düşme tespit edilmiştir.



Şekil 4.1. Farklı sürelerde (24, 48, 72 ve 96. saat) 2,4-D herbisitini karbon kaynağı olarak kullanan *P. aeruginosa* B1 suşunun bakteriyal gelişimi ve piyosiyanın pigmenti üretimi

Çizelge 4. 9. *Pseudomonas aeruginosa* suşlarının 50 mg/mL 2,4-D ve % 1' lik benzende belli zaman aralıklarındaki (24, 48, 72 ve 96. saatlerdeki) biyodegradasyonu esnasında piyosiyanın üretimleri (µg/mL)

Bakteri Türü	Suş No	50 mg/mL 2,4-D' deki Piyosiyanın Üretimi (µg/mL)				% 1 (v/v) Benzen' deki Piyosiyanın Üretimi (µg/mL)			
		24. saat	48. saat	72. saat	96. saat	24. saat	48. saat	72. saat	96. saat
<i>P. aeruginosa</i>	<b>B1</b>	<b>1,7±0,1</b>	<b>1,7±0,0</b>	<b>4,1±0,1</b>	<b>0,01±0,00</b>	-	0,90±0,00	-	-
	B2	1,5±0,0	1,5±0,0	2,8±0,0	0,60±0,00	-	0,90±0,00	0,20±0,00	-
	B3	-	1,2±0,0	1,5±0,0	0,10±0,00	-	<b>1,30±0,00</b>	-	-
	B16	-	1,6±0,0	1,8±0,0	0,03±0,00	-	0,90±0,00	0,01±0,00	-
	B19	-	1,6±0,0	2,2±0,0	0,06±0,00	-	0,80±0,00	-	-
	B20	1,2±0,0	1,8±0,0	3,8±0,1	0,03±0,00	-	0,02±0,00	-	-

-: Piyosiyanın üretimi belirlenememiştir.

Çizelge 4. 10. *Pseudomonas* spp. suşlarının % 1' lik BTX ve % 2' lik benzinde belli zaman aralıklarındaki (24, 48, 72 ve 96. saatlerdeki) biyodegradasyonu esnasında piyosiyanın üretimleri (µg/mL)

Bakteri Türü	Suş No	%1 (v/v) BTX' deki Piyosiyanın Üretimi				% 2 (v/v) Benzindeki Piyosiyanın Üretimi			
		24. saat	48. saat	72. saat	96. saat	24. saat	48. saat	72. saat	96. saat
<i>P. aeruginosa</i>	B1	-	0,70±0,00	-	-	0,01±0,00	0,06±0,00	0,06±0,00	0,6±0,0
	B2	-	1,10±0,00	-	-	0,03±0,00	0,10±0,00	0,10±0,00	0,7±0,0
	<b>B3</b>	-	<b>1,20±0,00</b>	-	-	<b>0,03±0,00</b>	<b>0,10±0,00</b>	<b>0,60±0,00</b>	<b>0,8±0,0</b>
	B16	-	0,90±0,00	-	-	-	0,08±0,00	0,10±0,00	0,5±0,0
	B19	-	1,10±0,00	-	-	0,03±0,00	0,20±0,00	0,50±0,00	0,7±0,0
	B20	-	0,03±0,00	-	-	0,10±0,00	0,20±0,00	0,40±0,00	0,7±0,0

-: Piyosiyanın üretimi belirlenememiştir.

#### 4.8. Minimal Besiortamında *Pseudomonas* spp. Suşlarının Organik Kirleticileri Biyodegradasyonu Esnasında Ekzopolisakkarit (EPS) Üretimlerinin Belirlenmesi

Araştırmada kullanılan *Pseudomonas* spp. suşlarının belli zaman aralıklarında (24, 48, 72 ve 96. saatlerdeki) minimal besiortamında karbon kaynağı olarak organik kirleticileri (50 mg/L 2,4-D, % 1 benzen ve BTX, % 2 benzin) biyodegradasyonu esnasında ekzopolisakkarit üretimleri Bölüm 3.2.4' de anlatıldığı gibi yapılmış ve sonuçlar Çizelge 4.11 ve Çizelge 4.12' de verilmiştir.

Minimal besiortamında 2,4-D herbisitini kullanan *Pseudomonas* spp. suşları arasında en yüksek EPS üretimi *P. aeruginosa* B1 (40 mg/L) ve *P. aeruginosa* B20 (35 mg/L) suşlarında 72. saatte görülmektedir. *Pseudomonas* spp. suşları 2,4-D herbisitinde en iyi gelişimi ve EPS üretimini 72. saatte göstermiştir (Çizelge 4.7, Çizelge 4.9). genel olarak tüm suşlarda EPS üretiminin 72. saate kadar arttığı ondan sonra azaldığı belirlenmiştir (Çizelge 4.7 ve Çizelge 4.11). *P. aeruginosa* B1 suşunun 2,4-D herbisitinde yüksek EPS üretimi yanı sıra en iyi gelişen ve en iyi piyosiyanın oluşturan suş olduğu dikkati çekmektedir (Çizelge 4.9). *Pseudomonas* sp. türlerinin ikinci derecede yüksek EPS üretimleri ise *P. aeruginosa* B3 (33 mg/L), *P. fluorescens* B5 (33 mg/L), *P. aeruginosa* B19 (28 mg/L), *P. stutzeri* B11 (24 mg/L), *P. aeruginosa* B16 (22 mg/L), *P. stutzeri* B10 (21 mg/L), *P. fluorescens* B4 (20 mg/L) olarak tespit edilmiştir (Çizelge 4.11).

% 1' lik benzene karbon kaynağı olarak kullanan *Pseudomonas* spp. suşları arasında en yüksek üretimi *P. fluorescens* B5 (33 mg/L) suşu 72. saatte göstermiştir. Diğer yüksek EPS üreten suşlar sırasıyla *P. aeruginosa* B3 (28 mg/L), *P. fluorescens* B4 (28 mg/L) ve *P. fluorescens* B6 (23 mg/L) olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.11). Bu suşlar içinde *P. aeruginosa* B3 suşu hariç diğer suşlar 2,4-D' de olduğu gibi benzende de en yüksek EPS üretimini 72. saatte göstermiştir. Benzende gelişip yüksek EPS üreten suşlardan biri olan *P. aeruginosa* B3 suşunun piyosiyanın üretiminin de yüksek olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.9). % 1' lik benzende en iyi

gelişen(Çizelge 4.7) ve EPS üreten suşun *P. fluorescens* B5 olduğu ve EPS üretiminin bakteri gelişimine bağlı olduğu söylenebilir.

Karbon kaynağı olarak kullanan % 1' lik BTX' i kullanan *Pseudomonas* spp. suşları EPS üretimini 48. saatte gerçekleştirmiş olup bu suşlar arasından % 1' lik BTX' de en iyi gelişim gösteren (Çizelge 4.8) ve en iyi EPS üreten suşun *P. stutzeri* B11 (30 mg/L) olduğu ve bakteriyal gelişimin ve EPS üretiminin 48. saatte gerçekleştiği tespit edilmiştir. BTX' de yüksek EPS üreten diğer *Pseudomonas* sp.' leri sırasıyla *P. fluorescens* B5 (25 mg/L), *P. aeruginosa* B3 (23 mg/L), *P. stutzeri* B8 (24 mg/L) olarak bulunmuş ve en iyi üretim 48. saatte belirlenmiştir (Çizelge 4.12).

Çalışmada kullanılan suşların % 2' lik benzindeki gelişimlerine paralel olarak EPS üretimlerinin de 96. saatte gerçekleştiği ve üretimin diğer organik bileşikleri kullanan suşların EPS üretimlerinden düşük olduğu gözlenmiştir. Buna göre % 2' lik benzindeki gelişimi en yüksek olan *P. aeruginosa* B3 suşunun diğer suşlara göre EPS üretiminin de (9 mg/L) yüksek olduğu tespit edilmiştir. Denemelerde kullanılan diğer *Pseudomonas* spp.' leri arasındaki EPS üretimleri de 96. saatte gerçekleşmiş ve *P. putida* B15 (8 mg/L), *P. fluorescens* B7 (7 mg/L), *P. putida* B12 (7 mg/L), *P. cepecia* (7 mg/L), *P. stutzeri* B10 (6 mg/L), *P. aeruginosa* B16 (5 mg/L) ve *P. luteola* B17 (5 mg/L) olarak bulunmuştur. Çalışmada kullanılan suşların % 2' lik benzinde diğer organik bileşiklerdeki gelişimlerine kıyasla daha az olduğu ve buna bağlı olarak EPS üretimlerinin de bu bileşikte daha düşük olduğu söylenebilir (Çizelge 4.12).

Bu çalışmada *Pseudomonas* spp. suşlarının kullanılan 4 farklı organik kirleticinin (2,4-D, benzin, BTX ve benzen) biyodegradasyonu ile EPS üretiminde en iyi gelişimi ve EPS üretimini 2,4-D herbisitinde *P. aeruginosa* B1 suşu göstermiştir. Bu suşun 24-96. saatler arasındaki EPS üretimi ve gelişimi Şekil 4.2' de gösterilmiştir. Bu suş ürettiği EPS' nin monomer yapısını araştırmak üzere HPLC analizi için seçilmiştir. Benzin, BTX ve benzeni karbon kaynağı olarak kullanıp 24-96. saatler arasında en iyi gelişimi gösteren suşlar ve EPS üretimleri Şekil 4.3-Şekil 4.5' de verilmiştir.

Çizelge 4.11. *Pseudomonas* spp. suşlarının 50 mg/mL 2,4-D ve % 1' lik benzende belli zaman aralıklarındaki (24, 48, 72 ve 96. saatlerdeki) EPS üretimi (mg/L)

Bakteri Türleri	Suş No	50 mg/mL 2,4-D' deki EPS üretimi (mg/L)				% 1 (v/v) Benzen' deki EPS üretimi (mg/L)			
		24. saat	48. saat	72. saat	96. saat	24. saat	48. saat	72. saat	96. saat
<i>P. aeruginosa</i>	B1	<b>33±0</b>	<b>35±2</b>	<b>40±0</b>	<b>20±1</b>	8±0	17±0	5±1	-
	B2	1±0	4±0	7±0	5±0	4±1	17±0	4±1	1±0
	B3	26±1	30±0	33±0	13±0	<b>9±2</b>	<b>28±0</b>	<b>15±0</b>	<b>3±0</b>
	B16	12±0	15±0	22±0	10±0	2±0	17±1	4±0	-
	B19	20±0	25±0	28±1	20±0	1±0	5±1	1±0	-
	B20	<b>28±0</b>	<b>31±1</b>	<b>35±1</b>	<b>20±1</b>	1±0	5±0	3±1	2±0
<i>P. fluorescens</i>	B4	5±0	14±0	20±1	10±0	<b>5±1</b>	<b>16±0</b>	<b>28±2</b>	<b>4±1</b>
	B5	19±0	25±0	33±0	11±0	<b>13±0</b>	<b>22±0</b>	<b>33±0</b>	<b>19±0</b>
	B6	12±0	13±1	18±0	9±0	5±0	12±0	23±0	1±0
	B7	7±0	9±0	14±0	5±0	5±0	10±0	11±2	2±0
<i>P. stutzeri</i>	B8	5±0	14±0	18±1	2±0	-	3±1	3±0	1±0
	B9	4±0	11±0	18±0	7±0	-	4±0	7±2	5±0
	B10	8±0	17±0	21±0	5±0	4±0	4±1	8±0	2±0
	B11	6±0	17±0	24±0	4±0	4±1	15±2	18±1	5±0
<i>P. putida</i>	B12	6±0	15±1	18±0	11±0	1±0	10±1	19±0	-
	B15	2±0	14±0	14±0	5±1	-	2±0	12±0	-
	B18	-	2±0	5±0	5±0	-	1±0	10±2	-
<i>P. cepecia</i>	B13	2±0	7±0	12±0	3±1	8±3	8±0	10±1	3±0
	B14	3±0	10±0	15±0	9±2	7±0	8±0	8±0	4±0
<i>P. luteola</i>	B17	2±0	12±0	12±0	8±0	5±0	10±0	17±0	1±0

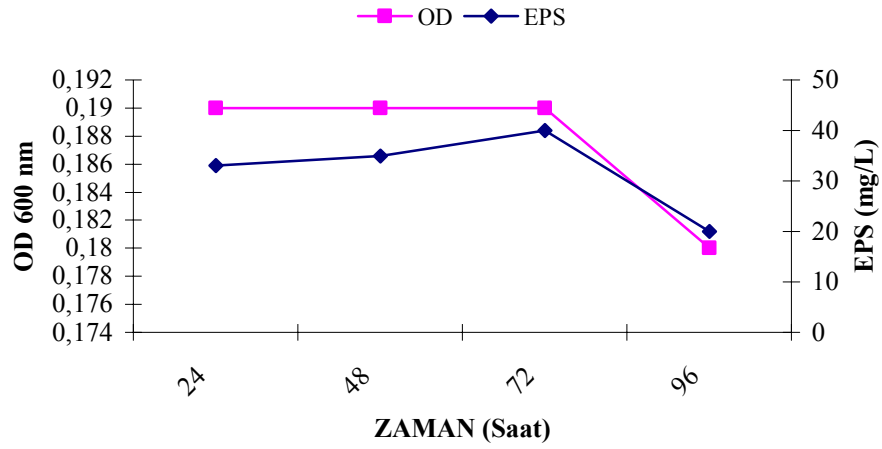
-: EPS üretimi belirlenmemiştir.

Çizelge 4. 12. *Pseudomonas* spp. suşlarının % 1' lik BTX ve % 2' lik benzinde belli zaman aralıklarındaki (24, 48, 72 ve 96. saatlerdeki) EPS üretimi (mg/L)

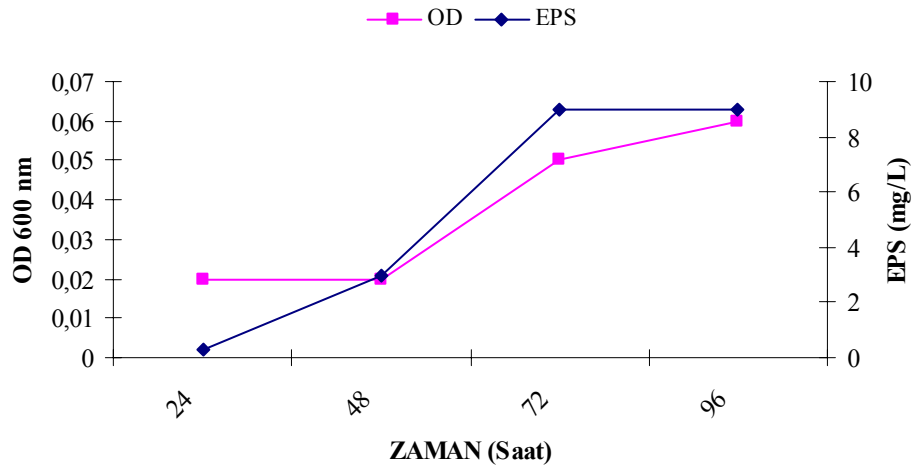
Bakteri Türleri	Suş No	%1 (v/v) BTX' deki EPS üretimi (mg/L)				% 2 (v/v) Benzindeki EPS üretimi (mg/L)			
		24. saat	48. saat	72. saat	96. saat	24. saat	48. saat	72. saat	96. saat
<i>P. aeruginosa</i>	B1	9±0	16±0	3±0	2±0	-	-	0,3±0,0	0,4±0,0
	B2	-	9±0	3±0	1±0	-	0,5±0,0	1,0±0,0	3,0±0,0
	B3	21±1	23±0	9±2	5±1	<b>0,3±0,0</b>	<b>3,0±0,0</b>	<b>9,0±1,0</b>	<b>9,0±0,0</b>
	B16	-	7±2	2±1	1±0	0,1±0,0	0,5±0,0	5,0±0,0	5,0±0,0
	B19	-	2±0	1±0	1±0	0,1±0,0	0,1±0,0	1,0±0,0	2,0±0,0
	B20	-	3±0	2±0	2±0	0,2±0,0	0,3±0,0	1,0±0,0	2,0±0,0
<i>P. fluorescens</i>	B4	2±0	17±0	3±0	2±0	-	0,1±0,0	0,2±0,0	0,3±0,0
	B5	2±0	25±1	9±3	5±0	0,5±0,0	0,8±0,2	2,0±0,0	3,0±0,0
	B6	8±2	14±1	2±0	2±0	0,1±0,0	0,1±0,0	0,4±0,0	1,0±0,0
	B7	2±0	6±1	3±0	2±0	0,5±0,0	1,0±0,0	7,0±1,0	7,0±1,0
<i>P. stutzeri</i>	B8	11±0	24±3	13±0	10±0	0,9±0,3	1,0±0,0	1,0±0,0	2,0±0,0
	B9	2±0	2±0	1±3	1±0	0,9±0,3	0,9±0,1	1,0±0,0	1,0±0,0
	B10	5±1	19±0	3±0	-	3,0±1,0	4,0±1,0	6,0±0,0	6,0±0,0
	B11	<b>11±0</b>	<b>30±1</b>	<b>29±0</b>	<b>15±0</b>	0,1±0,0	0,5±0,1	1,0±0,0	4,0±0,0
<i>P. putida</i>	B12	5±0	17±0	8±2	3±0	0,1±0,0	0,5±0,1	2,0±0,0	7,0±1,0
	B15	5±1	16±0	5±1	2±0	3,0±0,0	3,0±1,0	3,0±0,0	8,0±1,0
	B18	9±3	10±1	5±1	1±0	0,1±0,0	0,3±0,0	1,0±0,0	4,0±1,0
<i>P. cepecia</i>	B13	8±3	14±1	5±1	3±0	1,0±0,0	1,0±0,0	2,0±0,0	4,0±0,0
	B14	7±0	6±0	3±0	2±0	1,0±0,0	3,0±0,0	5,0±0,0	7,0±0,0
<i>P. luteola</i>	B17	10±0	17±3	9±0	8±0	1,0±0,0	2,0±0,0	4,0±0,0	5,0±0,0

-: EPS üretimi belirlenmemiştir.

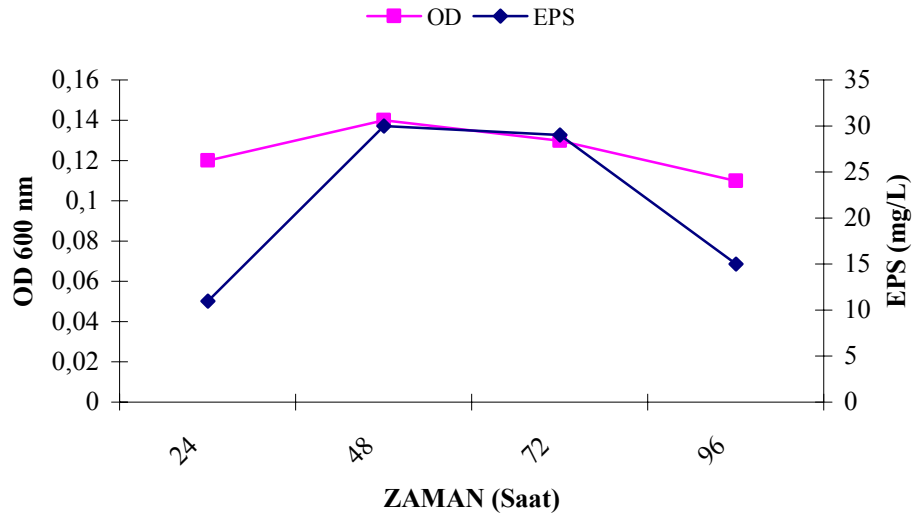




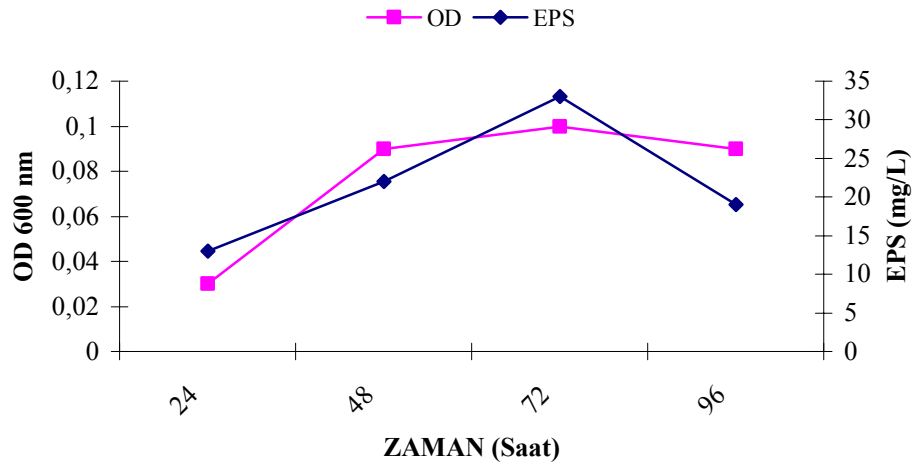
Şekil 4.2. Farklı sürelerde (24, 48, 72 ve 96. saat) 2,4-D herbisitini karbon kaynağı olarak kullanan *P. aeruginosa* B1 suşunun bakteriyal gelişimi ve EPS üretimi



Şekil 4.3. Farklı sürelerde (24, 48, 72 ve 96. saat) benzini karbon kaynağı olarak kullanan *P. putida* B15 suşunun bakteriyal gelişimi ve EPS üretimi



Şekil 4.4. Farklı sürelerde (24, 48, 72 ve 96. saat) BTX' i karbon kaynağı olarak kullanan *P. stutzeri* B11 suşunun bakteriyal gelişimi ve EPS üretimi



Şekil 4.5. Farklı sürelerde (24, 48, 72 ve 96. saat) benzeni karbon kaynağı olarak kullanan *P. fluorescens* B5 suşunun bakteriyal gelişimi ve EPS üretimi

#### 4.9. *Pseudomonas* spp. Suşlarının Bakteriyal Gelişimi Ve EPS Üretimi Arasındaki İlişkinin İstatistiksel Olarak Belirlenmesi

*Pseudomonas* spp. suşlarının bakteriyal gelişimi ve EPS üretimi arasındaki ilişki 3.2.6' da anlatıldığı gibi Pearson's korelasyonuna göre belirlenmiş ve sonuçlar Çizelge 4.13' de verilmiştir.

Çalışma da *Pseudomonas* spp. suşlarının bakteriyal gelişimi ile EPS üretimi arasında bir ilişki olup olmadığı Person's korelasyon testine göre araştırılmış ve 2,4-D herbisitinde 24, 48 ve 72. saatlerde sırasıyla  $\rho=0,639$ ,  $\rho=0,684$  ve  $\rho=0,737$ , benzinde 24 ve 48. saatlerde sırasıyla  $\rho=0,582$  ve  $\rho=0,493$ , BTX' de 24, 48, 72 ve 96. saatlerde sırasıyla  $\rho=0,630$ ,  $\rho=0,894$ ,  $\rho=0,793$  ve  $\rho=0,739$  ve benzende 24, 48, 72 ve 96. saatlerde sırasıyla  $\rho=0,675$ ,  $\rho=0,699$ ,  $\rho=0,867$  ve  $\rho=0,481$  bulunmuştur. Bu değerlere göre bakteriyal gelişimi ve EPS üretimi arasındaki ilişkinin 2,4-D herbisitinde 24, 48 ve 72. saatlerde  $\alpha= 0,01$  düzeyinde, benzinde 24. saatte  $\alpha= 0,01$ , 48. saatte  $\alpha= 0,05$  anlamlılık düzeyinde, BTX' de 24, 48, 72 ve 96. saattlerde  $\alpha= 0,01$ , benzende 24, 48 ve 72. saatlerde  $\alpha= 0,01$  ve 96. saatlerde  $\alpha= 0,05$  anlamlılık düzeyinde pozitif bir korelasyon olduğu tespit edilmiştir. *Pseudomonas* spp. suşlarının 96. saat de 2,4-D herbisitinde ve 72 ve 96. saatlerde benzinde ki bakteriyal gelişim ve EPS üretimi arasında herhangi bir ilişkiye rastlanılmamıştır.

Çizelge 4.13. *Pseudomonas* spp. suşlarının çeşitli organik kirleticilerin farklı sürelerde bakteriyal gelişim ve EPS üretimi arasındaki  $p$  değeri ve anlamlılık düzeyleri

Organik Kirleticiler	Süre (Saat)	$p$ değeri	Anlamlılık Düzeyi
2,4-D	24.	0,639	0,01
	48.	0,684	0,01
	72.	0,737	0,01
Benzin	24.	0,582	0,01
	48.	0,493	0,05
BTX	24.	0,630	0,01
	48.	0,894	0,01
	72.	0,793	0,01
	96.	0,739	0,01
Benzen	24.	0,675	0,01
	48.	0,699	0,01
	72.	0,867	0,01
	96.	0,481	0,05

#### 4.10. Minimal Besiortamında *Pseudomonas* spp. Suşlarının Organik Kirleticileri Biyodegradasyonu Esnasında Ramnolipid Üretimlerinin Belirlenmesi

Çalışmada kullanılan *Pseudomonas* spp. suşlarının minimal besiortamında belli zaman aralıklarında organik bileşiklerin degradasyonu esnasında ramnolipid üretimleri, 3.2.4' de anlatıldığı gibi tespit edilmiş ve sonuçlar Çizelge 4.14' de verilmiştir.

*Pseudomonas* spp. suşlarının minimal besiortamında 2,4-D herbisitini biyodegradasyonu esnasında en yüksek ramnolipid üretimini 72. saatte *P. aeruginosa* B1 (45 mg/L) suşu göstermiştir. Ramnolipid üreten diğer suşlar ise sırasıyla *P. aeruginosa* B3 (10 mg/L), *P. fluorescens* B5 (5 mg/L), *P. aeruginosa* B20 (2 mg/L)

ve *P. aeruginosa* B2 (0,5 mg/L) olarak tespit edilmiştir. Ramnolipid üreten bu suşların dışındaki suşlarda ramnolipid üretimine rastlanılmamıştır.

% 1 benzeni ve % 1 BTX' i kullanan *Pseudomonas* spp. suşları arasından en yüksek ramnolipid üretimleri 72. saatte sırasıyla benzende *P. fluorescens* B5 (1,5 mg/L), BTX' de *P. aeruginosa* B3 (0,5 mg/L) ve *P. aeruginosa* B19 (0,3 mg/L) tarafından gerçekleştirilmiştir. Bu suşların dışında çalışmada kullanılan diğer suşların % 1 benzen ve % 1 BTX' de ramnolipid üretmedikleri ve 2,4-D herbisitini kullanan suşlara göre daha düşük oranda ramnolipid ürettikleri tespit edilmiştir.

Karbon kaynağı olarak % 2 benzini kullanan çalışmadaki *Pseudomonas* spp. suşlarından en yüksek üretimi *P. putida* B15 (52 mg/L) suşu göstermiştir (Çizelge 4.13). Bu suşun 2,4-D herbisitini kullanan *P. aeruginosa* B1 suşunun ürettiği ramnolipidden daha yüksek bir üretim gösterdiği tespit edilmiştir (Çizelge 4.13). Ramnolipid üreten diğer suşlar ise sırasıyla *P. stutzeri* B11 (31 mg/L), *P. aeruginosa* B16 (20 mg/L), *P. fluorescens* B4 (18 mg/L), *P. stutzeri* B10 (11 mg/L), *P. fluorescens* B6 (5 mg/L), *P. luteola* B17 (5 mg/L), *P. fluorescens* B5 (3 mg/L), *P. putida* B18 (2 mg/L) ve *P. aeruginosa* B3 (0,7 mg/L) olarak bulunmuştur. Bu suşların dışındaki suşlarda ramnolipid üretimine rastlanılmamıştır.

*Pseudomonas* spp. suşlarının 2,4-D herbisitinde, benzen, BTX ve benzinde 72. saatte ramnolipid üretimini gerçekleştirdikleri belirlenmiştir. Genelde ramnolipid üretimi sırasıyla benzin ve 2,4-D herbisitini karbon kaynağı olarak kullanan bazı *Pseudomonas* spp. suşlarında gözlenirken benzen ve BTX' i kullanan bazı suşlarda kayda değer bir üretim görülemediği tespit edilmiştir.

Denemelerde kullanılan *Pseudomonas* spp. suşlarının organik bileşikleri (2,4-D, benzen, BTX ve benzin) biyodegradasyonu esnasında en iyi ramnolipid üretiminin sırasıyla benzin ve 2,4-D herbisitinde, *P. putida* B15 ve *P. aeruginosa* B1 suşu tarafından gerçekleştirildiği belirlenmiştir. *P. aeruginosa* B1 suşu 2,4-D herbisitinde, *P. putida* B15 suşuda % 1' lik Benzinde en iyi bakteri gelişimi ve ramnolipid üretimi

belirlenmiş, bu sonuçlar Şekil 4.3, Şekil 4.4' de verilmiştir. Bu suşlar, ürettikleri ramnolipidin miktarını tespit etmek üzere HPLC analizi için seçilmiştir.

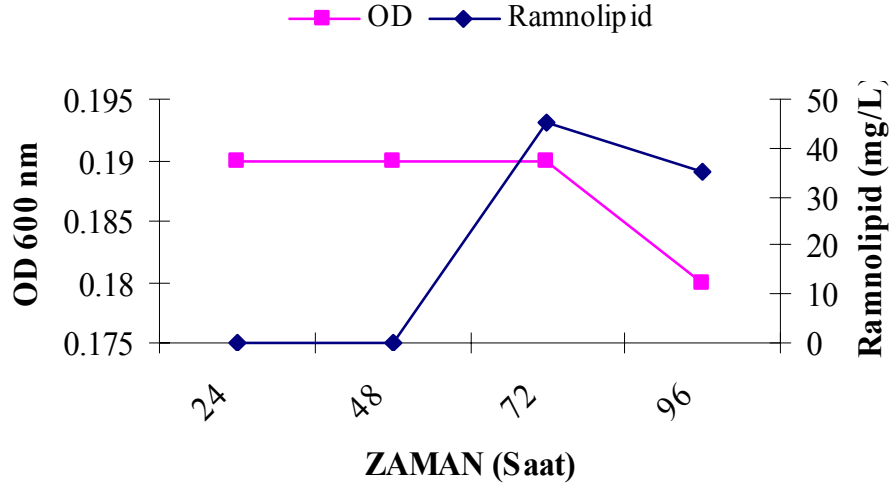
Tüm bu sonuçlara göre organik bileşikler arasından 2,4-D herbisitini diğer suşlara göre karbon kaynağı olarak en iyi kullanan ve bu esnada yüksek metabolit (piyosiyenin, EPS ve ramnolipid) üreten üstün suşun *P. aeruginosa* B1 (Çizelge 4.7, Çizelge 4.9 , Çizelge 4.11, Çizelge 4.14), hidrokarbonlar arasından diğer suşlara göre BTX' i karbon kaynağı olarak en iyi kullanan ve bu esnada yüksek EPS üreten suşun *P. stutzeri* B11 (Çizelge 4.8, Çizelge 4.12), benzinde yüksek ramnolipid üreten suşun da *P. putida* B15 olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.14). *P. aeruginosa* B1 ve *P. stutzeri* B11 suşları 2,4-D herbisiti ve BTX' i hangi oranda degrede ettiklerini, *P. aeruginosa* B1 suşu, EPS monomer yapısı, EPS, piyosiyenin, ramnolipid üretim miktarlarını, *P. putida* B15 suşu ise ramnolipid üretim miktarını belirlemek üzere HPLC analizi için seçilmişlerdir.

Çizelge 4.14. *Pseudomonas* spp. suşlarının 50 mg/mL 2,4-D, % 1' lik benzende, % 1' lik BTX ve % 2' lik benzinde belli zaman aralıklarındaki (72 ve 96. saatlerdeki) ramnolipid üretimi (mg/L)

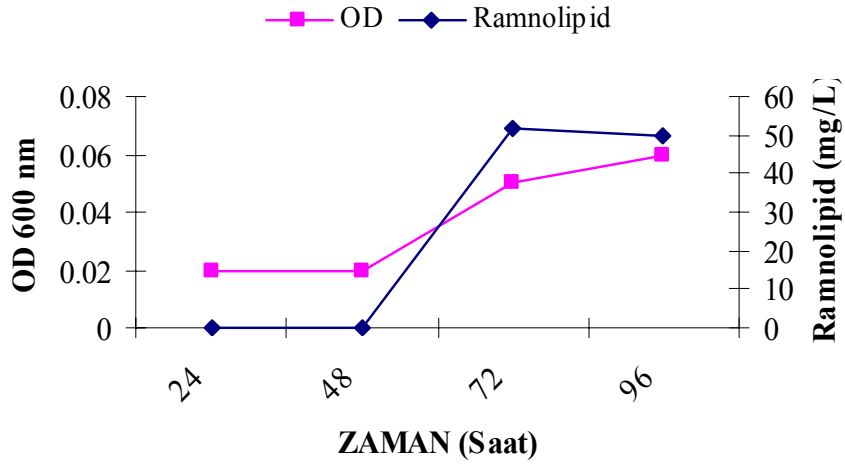
Bakteri Türleri	Suş No	50 mg/mL 2,4-D' deki Ramnolipid üretimi (mg/L)		%1 (v/v) Benzindeki Ramnolipid üretimi (mg/L)		%1 (v/v) BTX' deki Ramnolipid üretimi (mg/L)		% 2 (v/v) Benzindeki Ramnolipid üretimi (mg/L)	
		72. saat	96. saat	72. saat	96. saat	72. saat	96. saat	72. saat	96 saat
<i>P. aeruginosa</i>	B1	<b>45,0±0,3</b>	<b>35,0±0,01</b>	-	-	-	-	-	-
	B2	0,5±0,3	0,3±0,5	-	-	-	-	-	-
	B3	10,0±0,0	5,0±0,1	-	-	<b>0,5±0,0</b>	<b>0,2±0,0</b>	0,7±0,0	0,5±0,0
	B16	-	-	-	-	-	-	<b>20,0±0,1</b>	<b>10,0±0,0</b>
	B19	-	-	-	-	0,3±0,0	0,1±0,1	-	-
	B20	2,0±0,0	0,7±0,2	-	-	-	-	-	-
<i>P. fluorescens</i>	B4	-	-	-	-	-	-	18,0±0,2	10,0±0,0
	B5	5,0±0,0	1,0±0,1	<b>1,5±0,1</b>	<b>0,8±0,1</b>	-	-	3,0±0,0	1,0±0,0
	B6	-	-	-	-	-	-	5,0±0,0	1,0±0,0
	B7	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>P. stutzeri</i>	B8	-	-	-	-	-	-	-	-
	B9	-	-	-	-	-	-	-	-
	B10	-	-	-	-	-	-	11,0±0,1	1,0±0,0
	B11	-	-	-	-	-	-	<b>31,0±0,0</b>	<b>20,0±0,1</b>
<i>P. putida</i>	B12	-	-	-	-	-	-	-	-
	B15	-	-	-	-	-	-	<b>52,0±0,2</b>	<b>50,0±0,1</b>
	B18	-	-	-	-	-	-	2,0±0,3	1,0±0,0
<i>P. cepecia</i>	B13	-	-	-	-	-	-	-	-
	B14	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>P. luteola</i>	B17	-	-	-	-	-	-	5,0±0,0	1,0±0,0

-: Ramnolipid üretimi belirlenememiştir.

*Pseudomonas* spp. suşlarında 24 ve 48. saatlerde ramnolipid üretimi olmadığından tabloda verilmemiştir



Şekil 4.6. Farklı sürelerde (24, 48, 72 ve 96. saat) 50 mg/mL 2,4-D herbisitini karbon kaynağı olarak kullanan *P. aeruginosa* B1 suşunun bakteriyal gelişimi ve ramnolipid üretimi



Şekil 4.7. Farklı sürelerde (24, 48, 72 ve 96. saat) % 2' lik benzini karbon kaynağı olarak kullanan *P. putida* B15 suşunun bakteriyal gelişimi ve ramnolipid üretimi



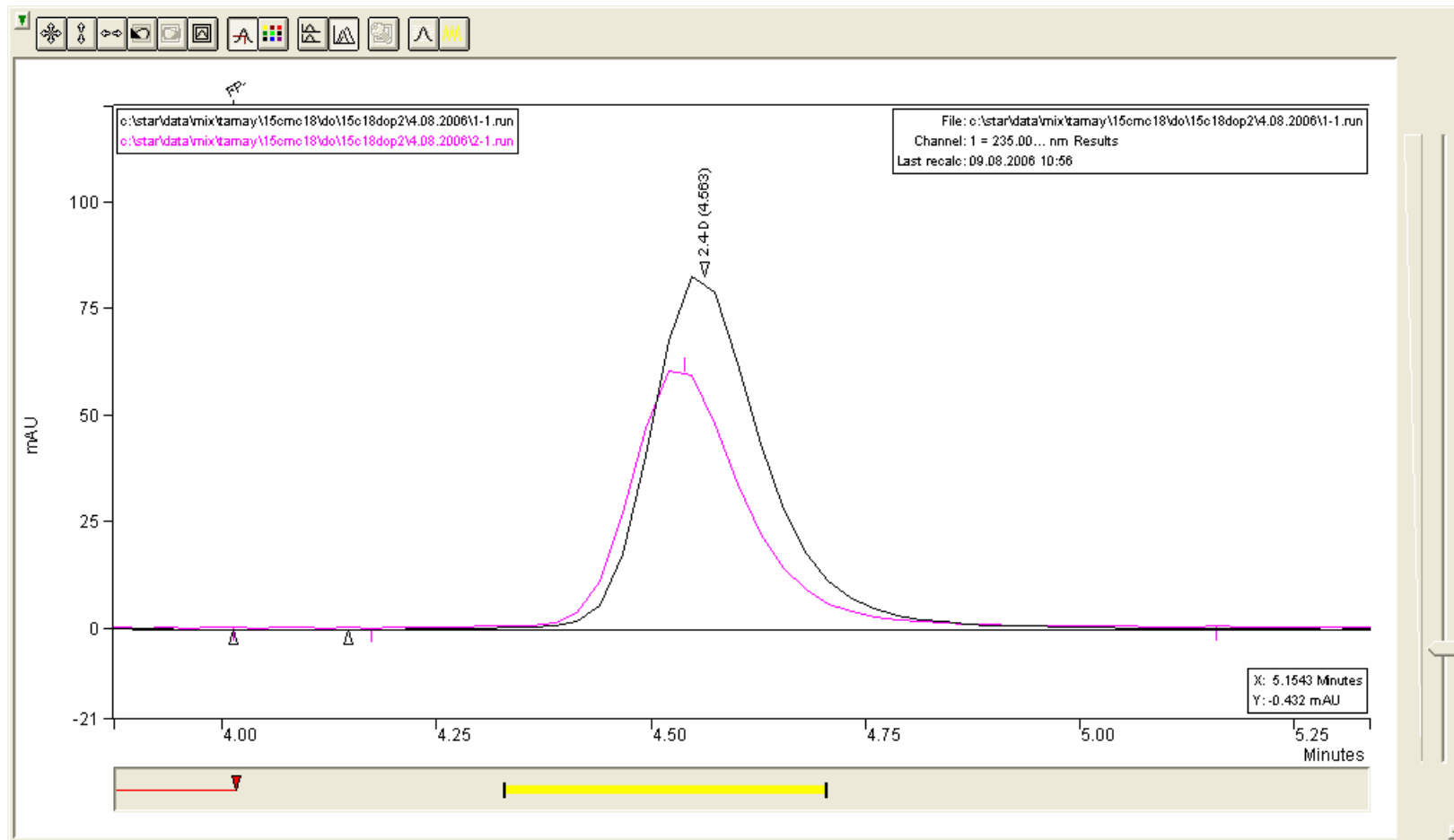
#### 4.11. Minimal Besiortamında *Pseudomonas aeruginosa* B1 Suşunun 2,4-D Herbisitini Biyodegradasyonunun High-Pressure Liquid Kromatografisi (HPLC) Analizi İle Belirlenmesi

Bölüm 4.9’ da seçilen *P. aeruginosa* B1 suşunun ortamdaki 2,4-D’ yi karbon kaynağı olarak kullanıp kullanmadığı, belli zaman aralıklarında (24, 48, 72 ve 96. saat) bu bileşiğin miktarındaki azalma ile HPLC analizi yapılarak Bölüm 3.2.10’ da anlatıldığı gibi belirlenmiştir.

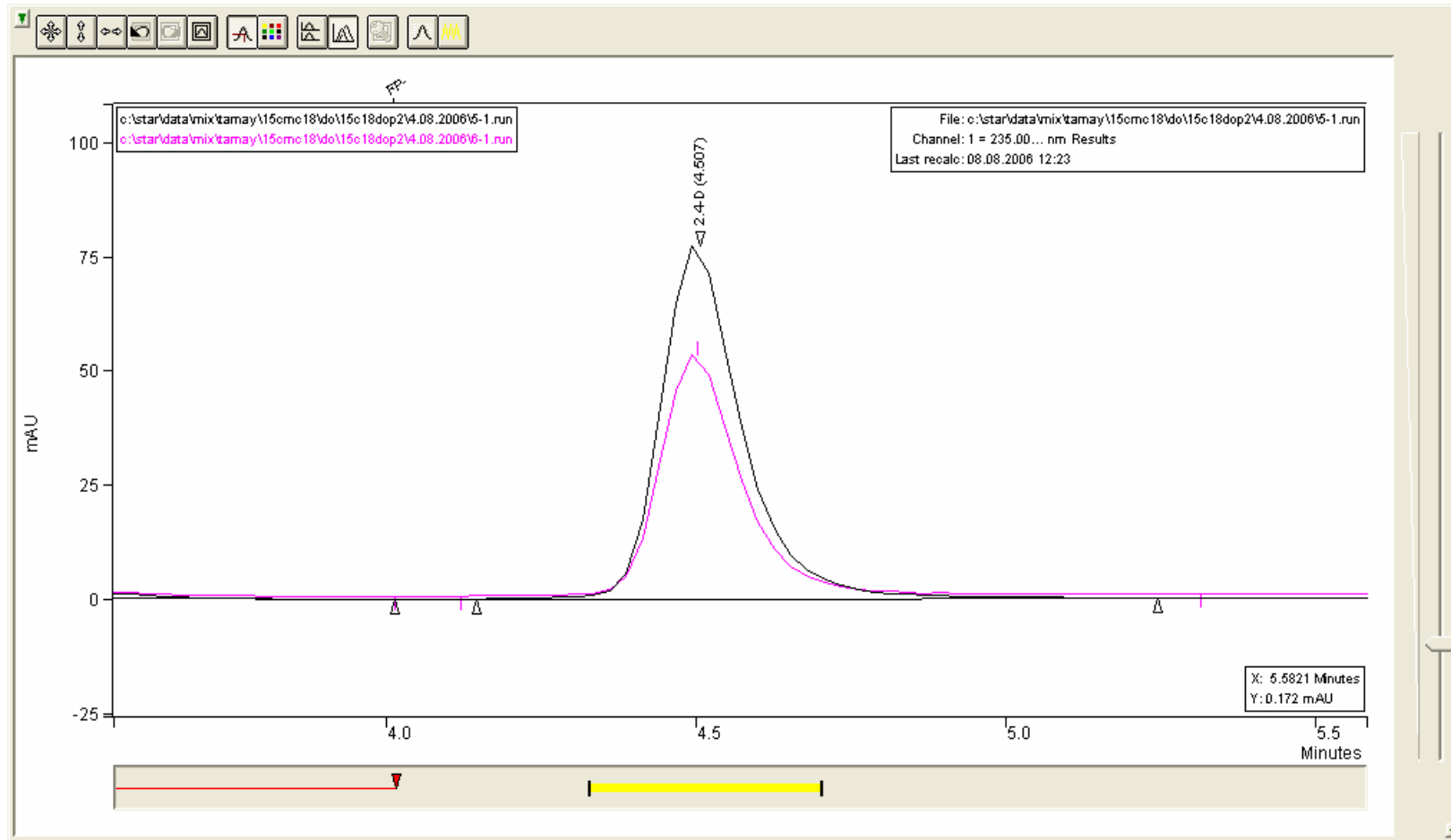
HPLC sonuçlarında kontrole göre 1. gün 50 mg/mL’ lik 2,4-D’ nin miktarında % 24’ lük bir azalma, 2. gün % 31’ lik azalma, 3. gün % 32’ lik azalma ve 4. gün ise % 33’ lik bir azalma olduğu tespit edilerek % degradasyon oranları Çizelge 4.15’ de verilmiştir. *P. aeruginosa* B1 suşunun 50 mg/L’ lik 2,4-D herbisitini belli zaman aralıklarında (24, 48, 72 ve 96. saat) degradasyon kromatogramları Şekil 4.8-Şekil 4.11’ de gösterilmiştir.

Çizelge 4.15. *P. aeruginosa* B1 suşunun 50 mg/L’ lik 2,4-D herbisitini belli zaman aralıklarında ki (24, 48, 72 ve 96. saat) degradasyon oranı

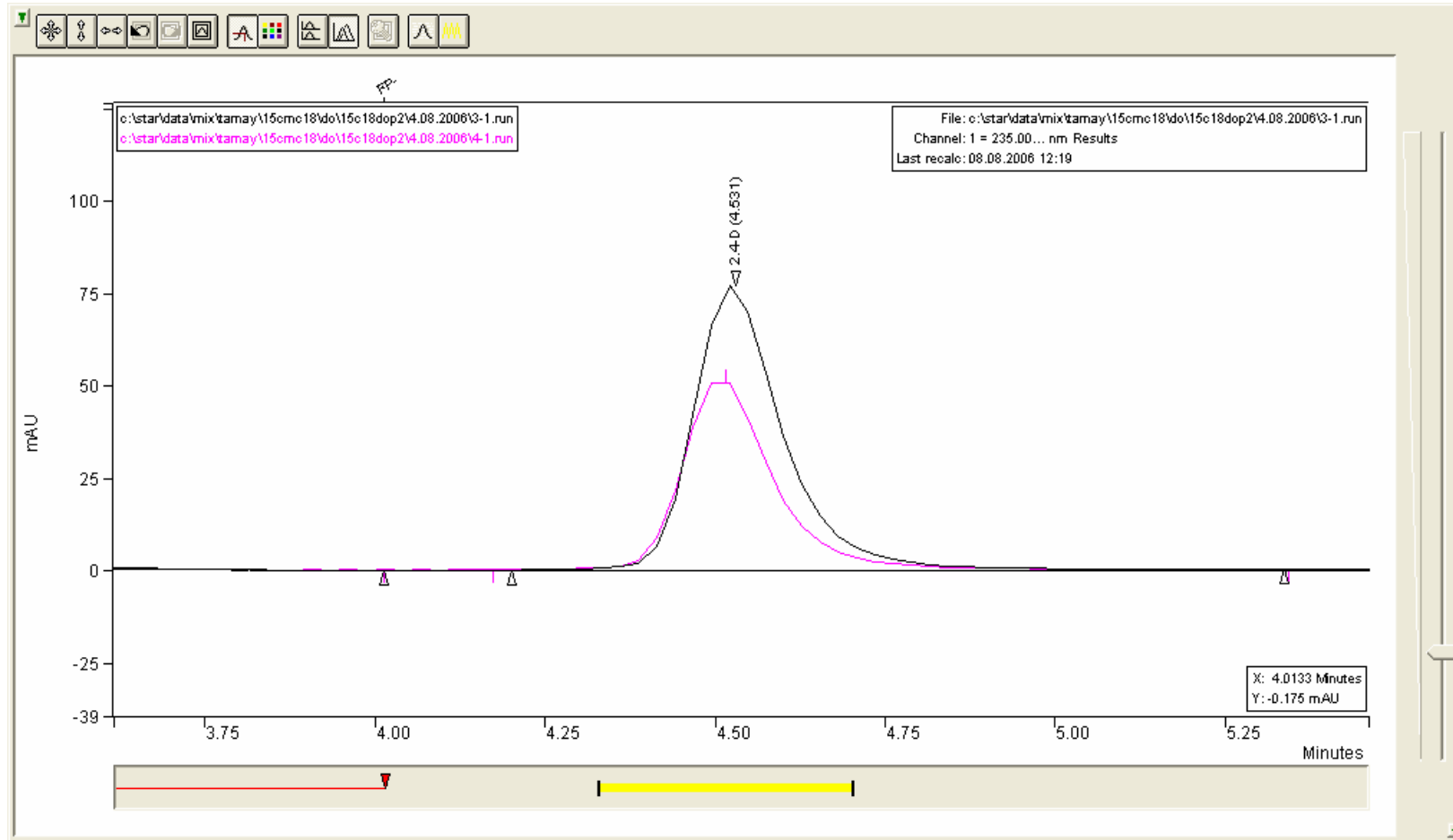
Bakteri	Substrat	Süre (Saat)	Substrat Konsantrasyonu (mg/mL)		Degradasyon oranı (%)
			İlk	Son	
<i>P. aeruginosa</i> B1	2,4-D	24	0,0291	0,0221	24
		48	0,0264	0,0183	31
		72	0,0279	0,0190	32
		96	0,265	0,0179	33



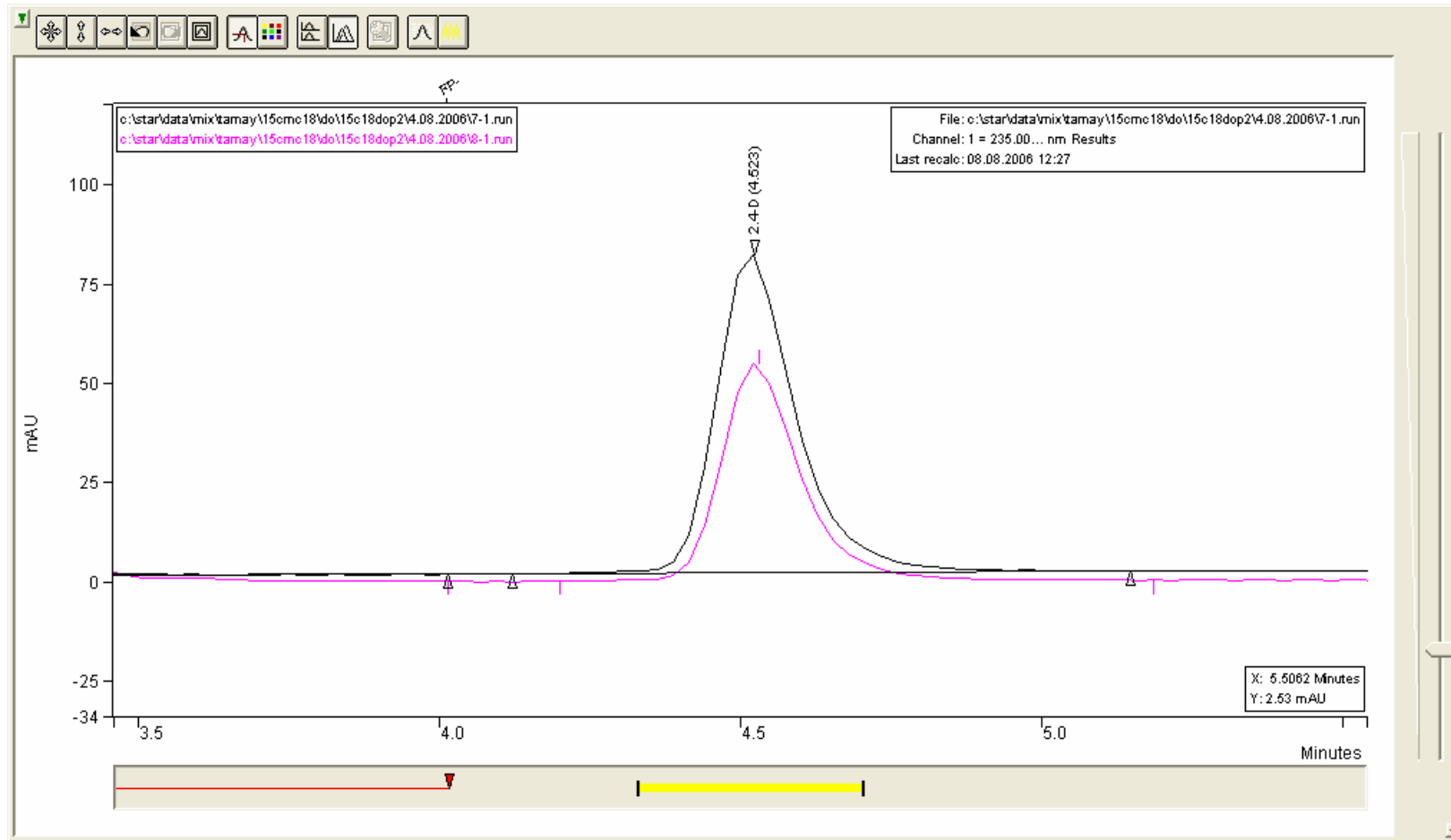
Şekil 4.8. *P. aeruginosa* B1 şununun 24. saatte 50 mg/L' lik 2,4-D herbisitinin degradasyon kromotogramı (Siyah pik: Kontrol: MSM+2,4-D, Pembe pik: MSM+*P. aeruginosa* B1+ 2,4-D)



Şekil 4.9. *P. aeruginosa* B1 suşunun 48. saatte 50 mg/L' lik 2,4-D herbisitinin degradasyon kromotogramı (Siyah pik: Kontrol MSM+2,4-D, Pembe pik: MSM+*P. aeruginosa* B1+ 2,4-D)



Şekil 4.10. *P. aeruginosa* B1 suşunun 72. saatte 50 mg/L' lik 2,4-D herbisitinin degradasyon kromotogramı (Siyah pik: Kontrol MSM+2,4-D, Pembe pik: MSM+*P. aeruginosa* B1+ 2,4-D)



Şekil 4.11. *P. aeruginosa* B1 suşunun 96. saatte 50 mg/L' lik 2,4-D herbisitinin degradasyon kromotogramı (Siyah pik: Kontrol MSM+2,4-D, Pembe pik: MSM+*P. aeruginosa* B1+ 2,4-D)

#### 4.12. Minimal Besiortamında 2,4-D Herbisiti, Benzin, BTX Ve Benzende Yüksek EPS Üreten Suşların Ürettikleri EPS' nin Monomer Yapısının High-Pressure Liquid Kromatografisi (HPLC) Analizi İle Belirlenmesi

*P. aeruginosa* B1, *P. putida* B15, *P. stutzeri* B11 ve *P. fluorescens* B5 suşlarının ortamdaki organik bileşikleri degradasyonu esnasında ürettikleri EPS' nin monomer yapısı için HPLC analizi yapılarak sonuçlar Çizelge 4.15' de verilmiştir.

2,4-D herbisitinde yüksek gelişim gösteren ve yüksek EPS üreten *P. aeruginosa* B1 suşunun NB besiortamında % 31 Glikoz, % 69 Gliserol ve 2,4-D+MSM besiortamlarında geliştirildiklerinde ise suşun şeker kompozisyonunda % 70 Gliserol, % 30 N-Asetil-D-Glikoz Amin içerdiği tespit edilmiştir.

Karbon kaynağı olarak benzeni kullanıp yüksek gelişim ve EPS üretimi gösteren *P. fluorescens* B5 suşunun NB besiortamında geliştirildiklerinde suşun şeker kompozisyonunda, % 1,9 Glikoz, % 20,4 Arabinoz, % 44,7 Gliserol, % 32,8 Riboz, % 0,2 Galaktronik asit ve benzen+MSM besiortamında geliştirildiklerinde ise suşun şeker kompozisyonunda % 92,2 Gliserol, % 7,7 Riboz, % 0,1 N-Asetil-D-Glikoz Amin içerdiği belirlenmiştir.

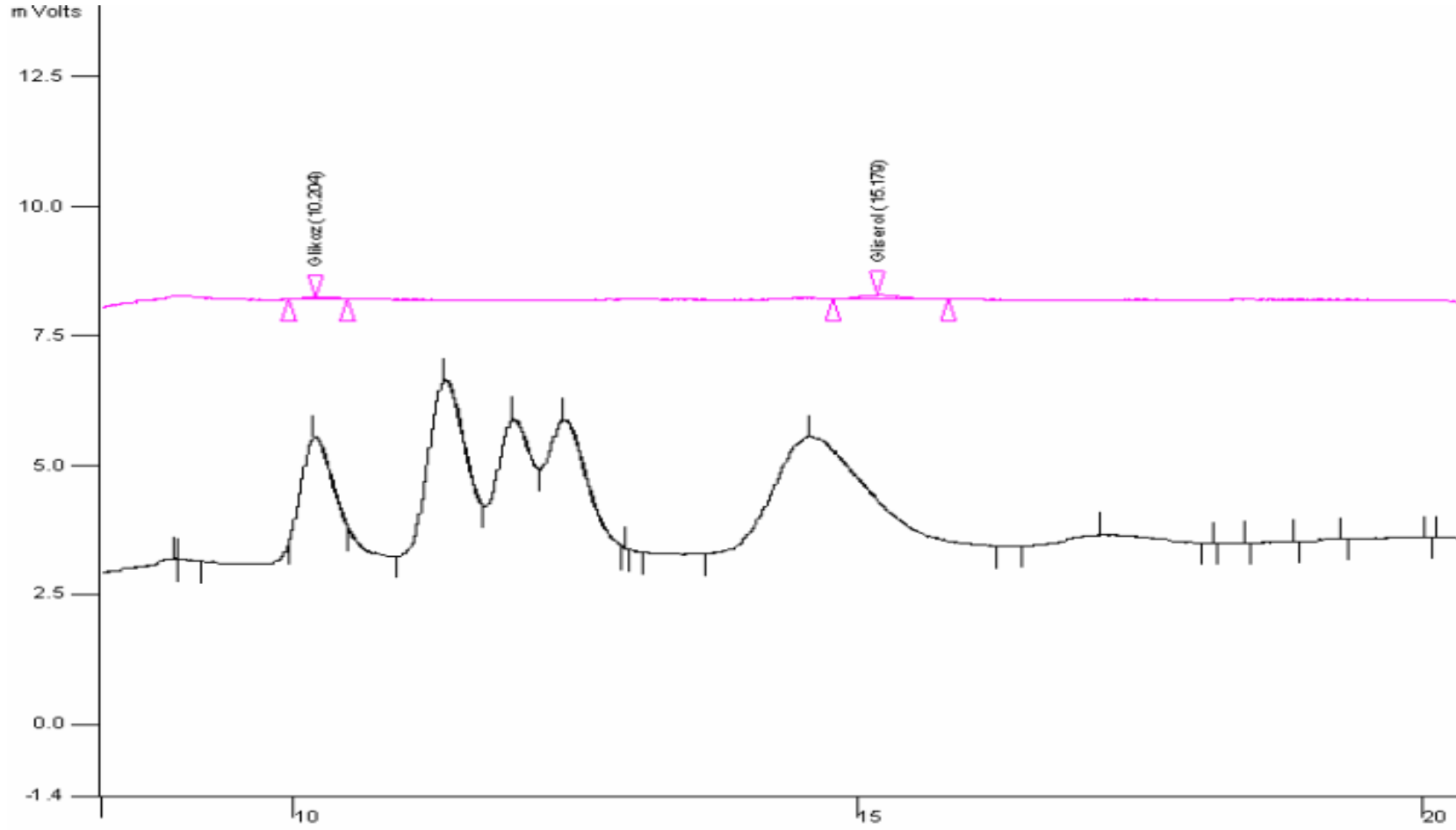
BTX' i karbon kaynağı olarak kullanıp bakteriyal gelişimi yüksek olan ve bu esnada yüksek miktarda EPS üreten *P. stutzeri* B11 suşunun NB besiortamında geliştirildiklerinde suşun şeker kompozisyonunda, % 98,8 Gliserol, % 0,97 Riboz, % 0,16 Galaktronik Asit, % 0,07 N-Asetil-D-Glikoz Amin ve BTX+MSM besiortamında geliştirildiklerinde ise % 98,2 Riboz ve % 1,8 N-Asetil-D-Glikoz Amin içerdiği bulunmuştur.

Benzinde yüksek gelişim gösteren ve yüksek EPS üreten *P. putida* B15 suşunun NB besiortamında geliştirildiklerinde suşun şeker kompozisyonunda, % 99,9 Gliserol, % 0,1 N-Asetil-D-Galaktoz Amin ve benzin+MSM besiortamında geliştirildiklerinde ise % 83,6 Gliserol, % 16,3 Galaktronik asit ve % 0,1 N-Asetil-D-Glikoz Amin içerdiği belirlenmiştir.

Çizelge 4.16. Farklı organik kirleticilerde (2,4-D, BTX ve benzen) gelişim gösteren yüksek EPS üreten suşların bu ortamda ürettikleri EPS' nin karbohidrat kompozisyonu

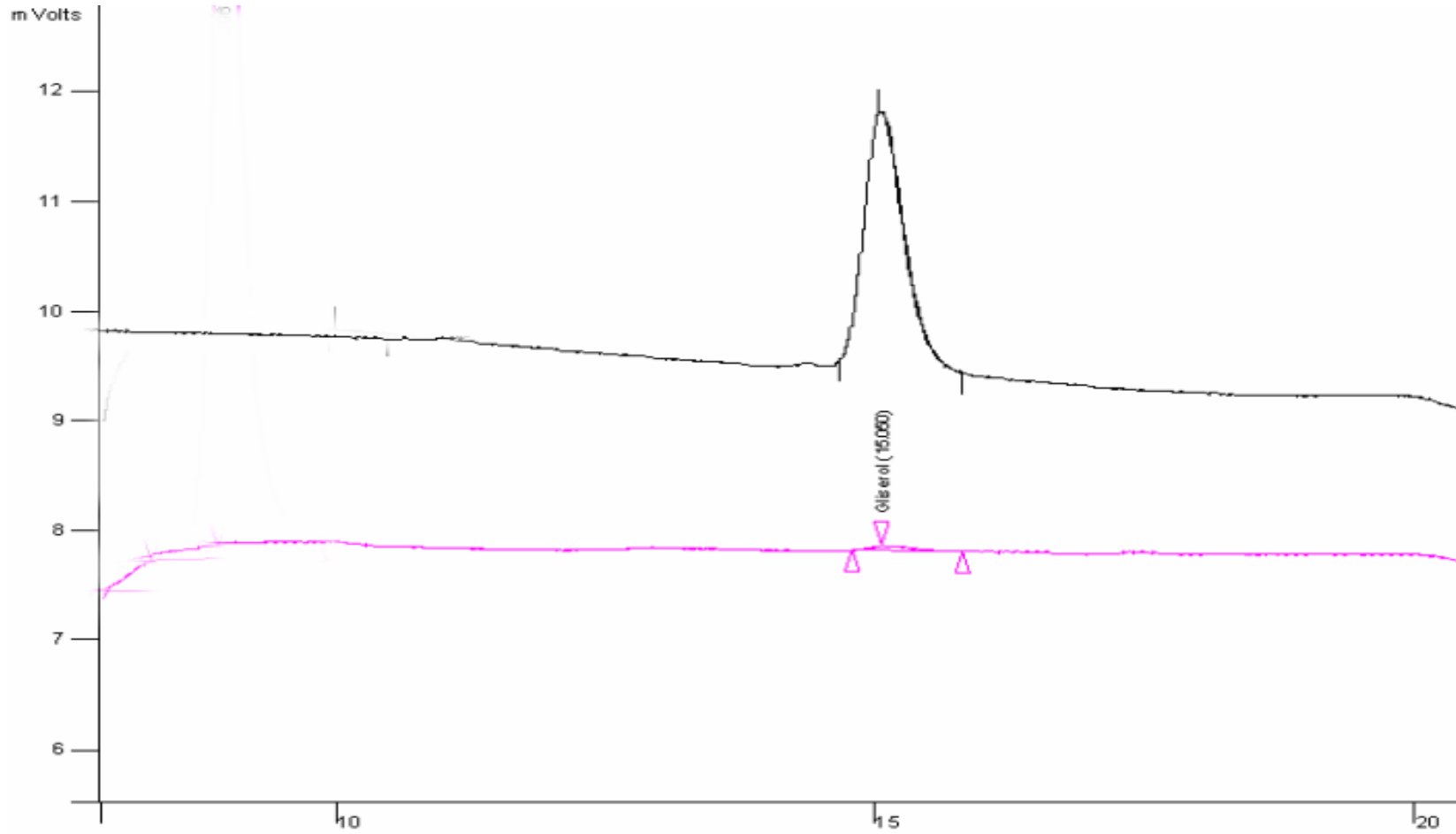
Suşlar	Gelişim Sübstratları	Monosakkaritler (%)											
		Glikoz	Ksiloz	Galaktoz	Ramnoz	Mannoz	Arabinoz	Mannitol	Gliserol	Riboz	Galaktronik Asit	N-Asetil-D-Galaktoz Amin	N-Asetil-D-Glikoz Amin
<i>P. aeruginosa</i> B1	NB	31,00	-	-	-	-	-	-	69,00	-	-	-	-
<i>P. aeruginosa</i> B1	MSM+2,4-D (50 mg/mL)	-	-	-	-	-	-	-	70,00	-	-	-	30,0
<i>P. fluorescens</i> B5	NB	1,90	-	-	-	-	20,40	-	44,70	32,80	0,20	-	-
<i>P. fluorescens</i> B5	MSM+Benzen (% 1v/v)	-	-	-	-	-	-	-	92,20	7,70	-	-	0,10
<i>P. stutzeri</i> B11	NB	-	-	-	-	-	-	-	98,80	0,97	0,16	-	0,07
<i>P. stutzeri</i> B11	MSM+BTX (% 1 v/v)	-	-	-	-	-	-	-	-	98,20	-	-	1,80
<i>P. putida</i> B15	NB	-	-	-	-	-	-	-	99,90	-	-	0,10	-
<i>P. putida</i> B15	MSM+Benzin (% 2 v/v)	-	-	-	-	-	-	-	83,60	-	16,30	-	0,10

-: Tespit edilemedi

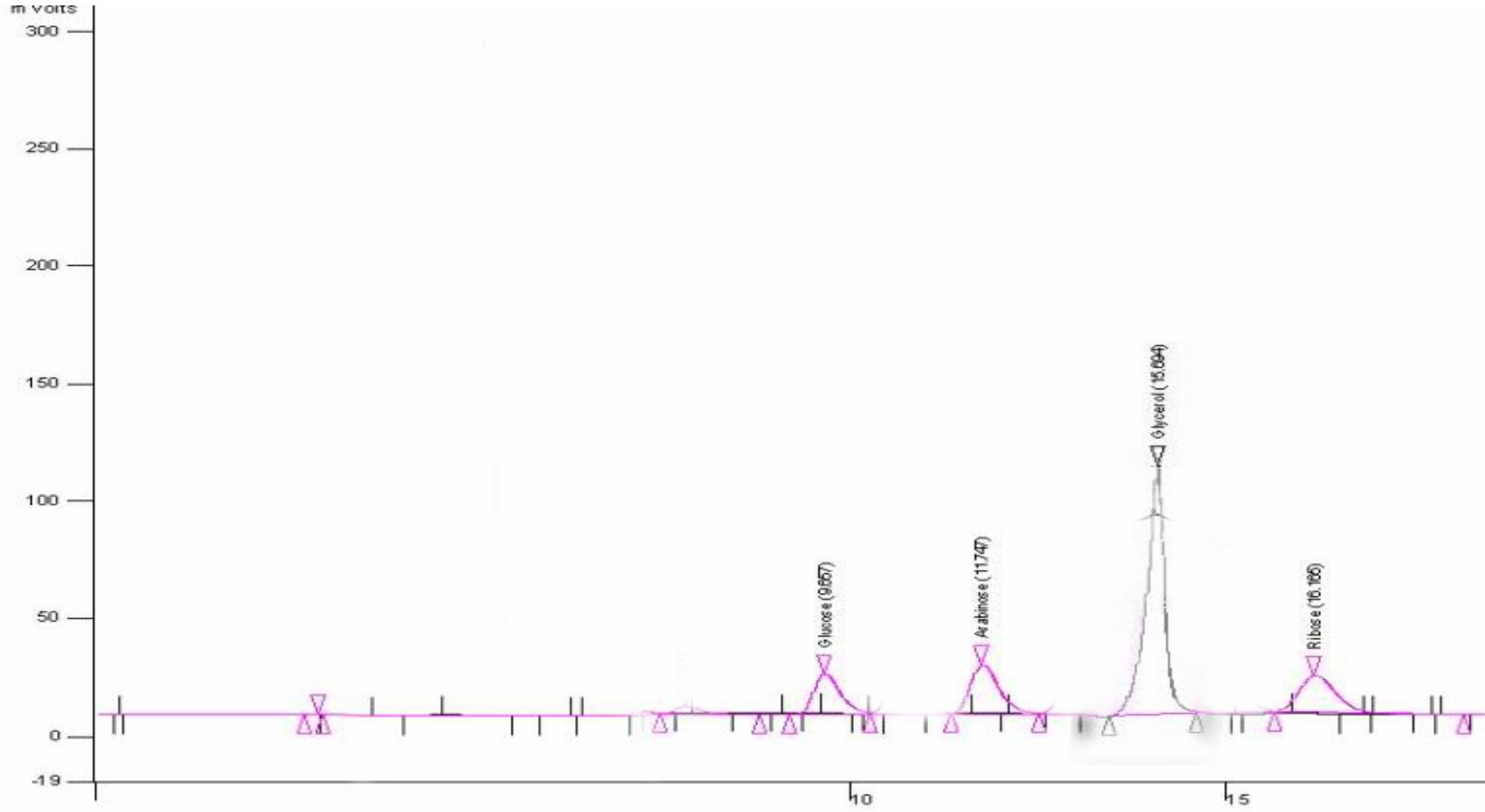


Şekil 4.12. *P. aeruginosa* B1 suşunun NB besi ortamında ürettiği EPS' nin şeker analiz kromatogramı (siyah pik: standart; pembe pik: örnek)

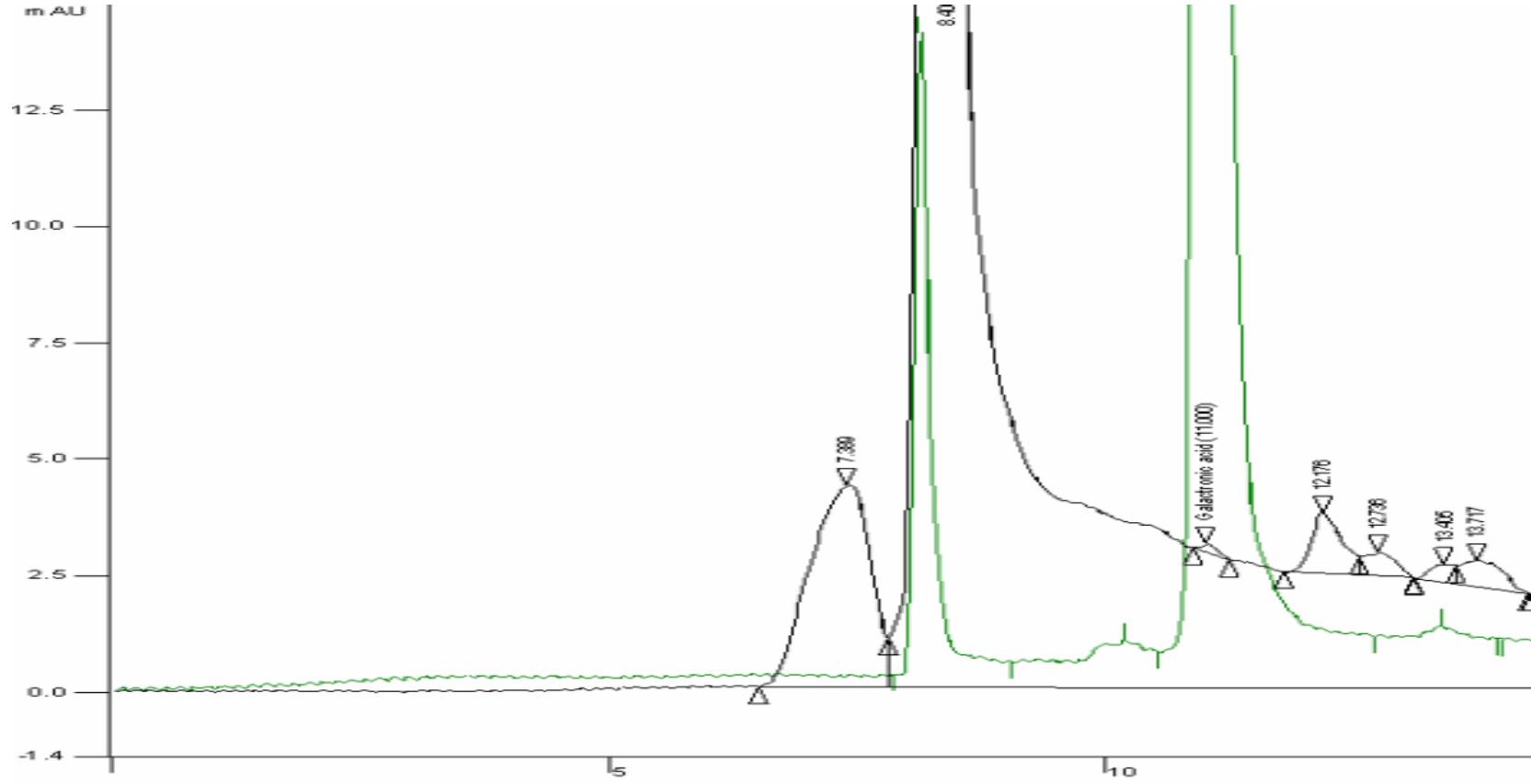




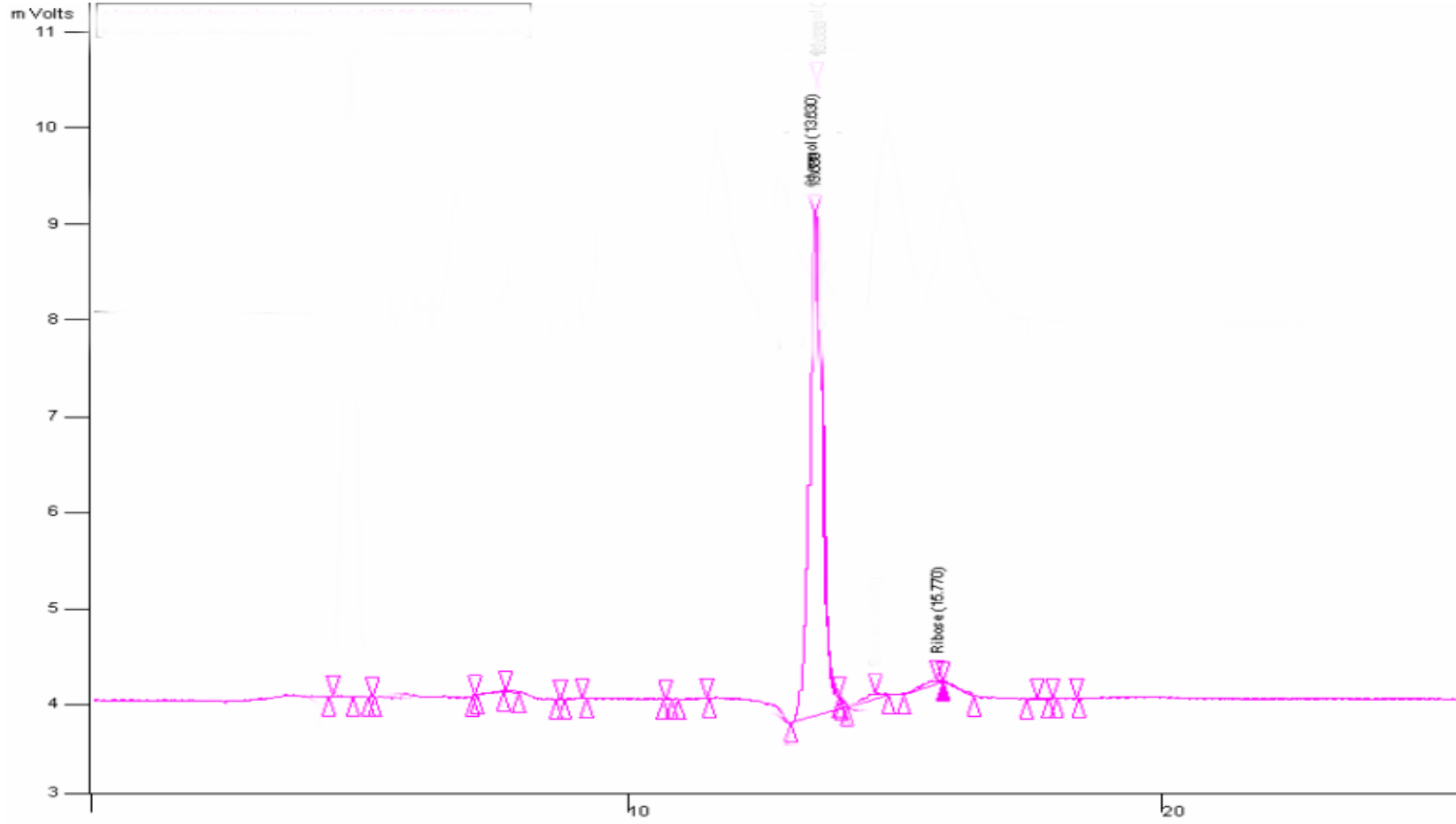
Şekil 4.13. *P. aeruginosa* B1 suşunun 2,4-D+MSM besiortamında ürettiği EPS' nin şeker analiz kromotogramı (siyah pik: standart; pembe pik: örnek)



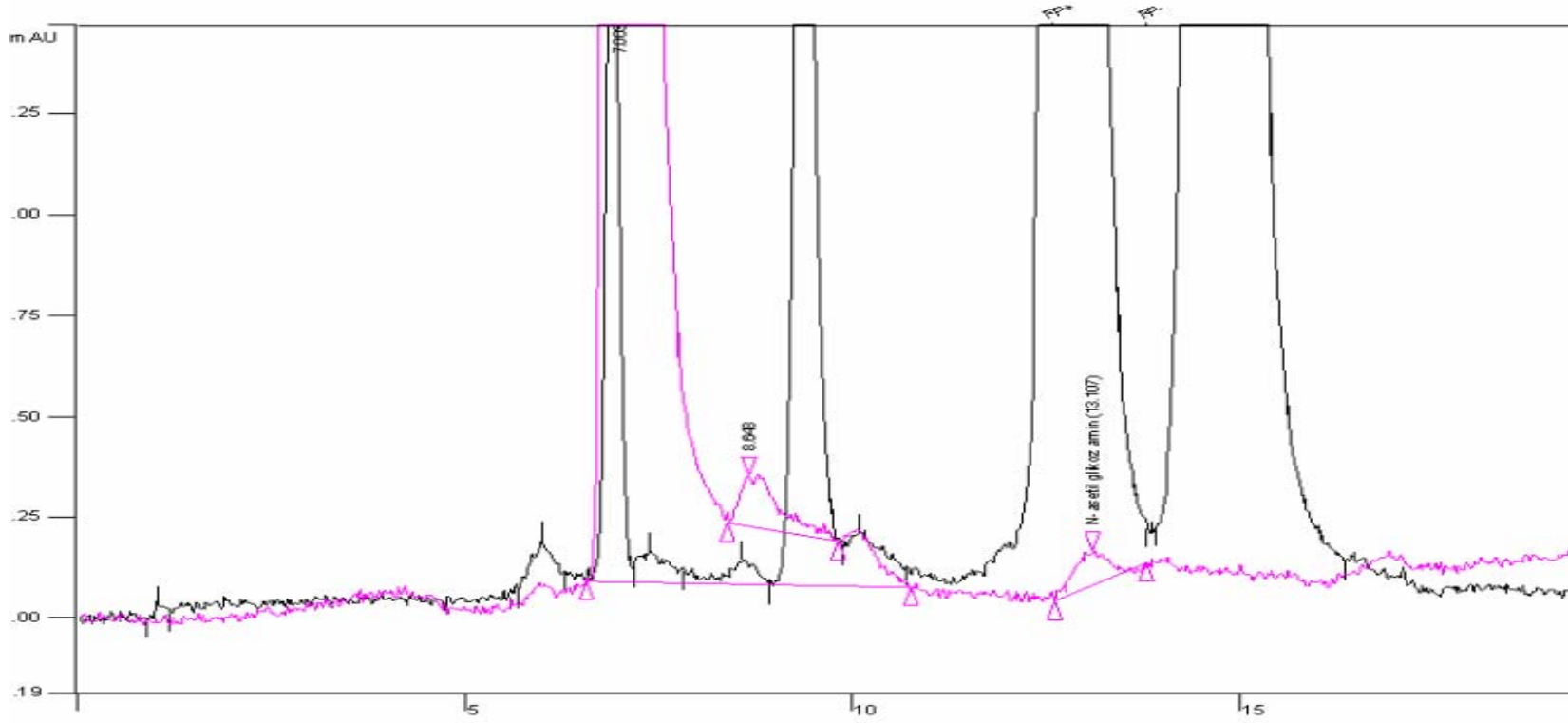
Şekil 4.14. *P. fluorescens* B5 suşunun NB besiyortamında ürettiği EPS' nin şeker analiz kromotogramı



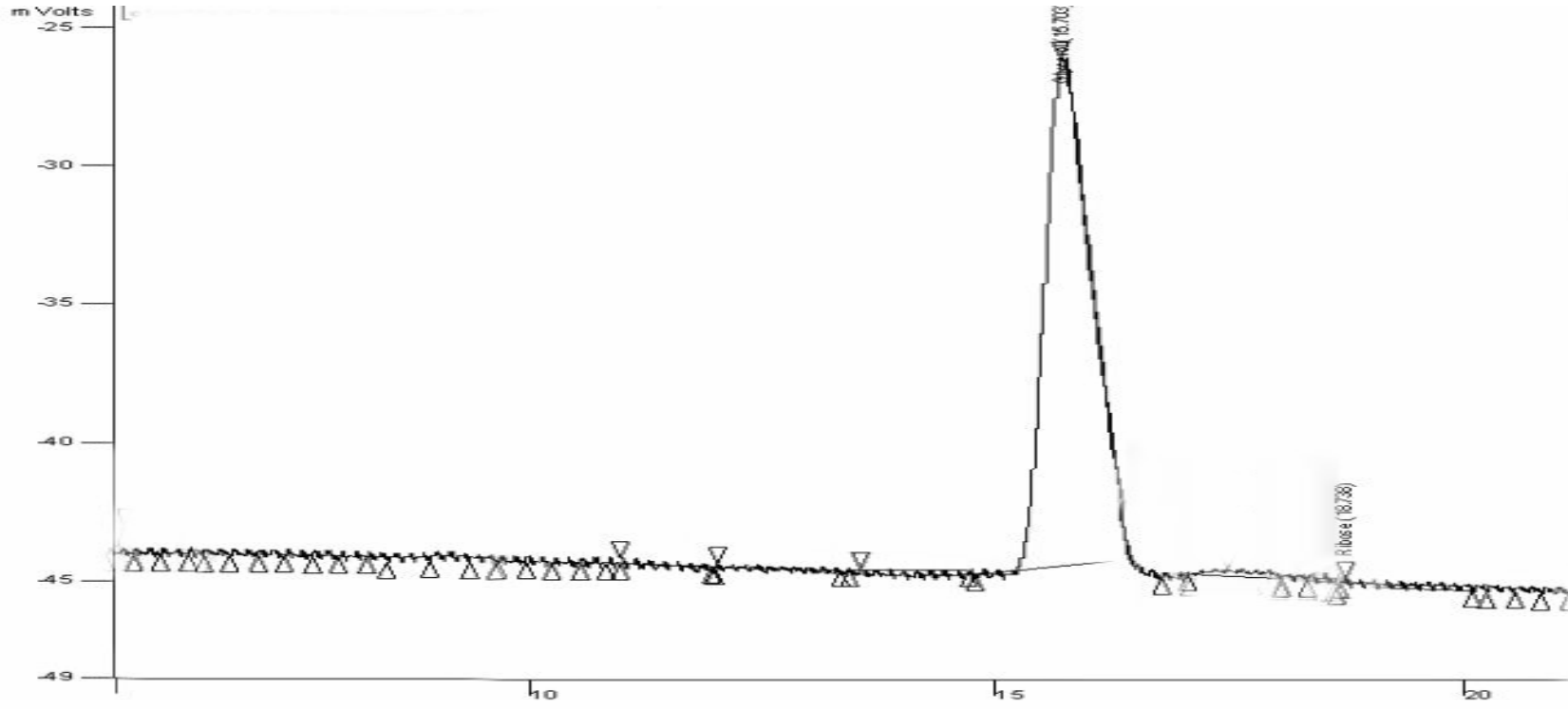
Şekil 4.15. *P. fluorescens* B5 suşunun NB besiortamında ürettiği EPS' nin asit analiz kromotogramı (Yeşil pik: standart, siyah pik: örnek)



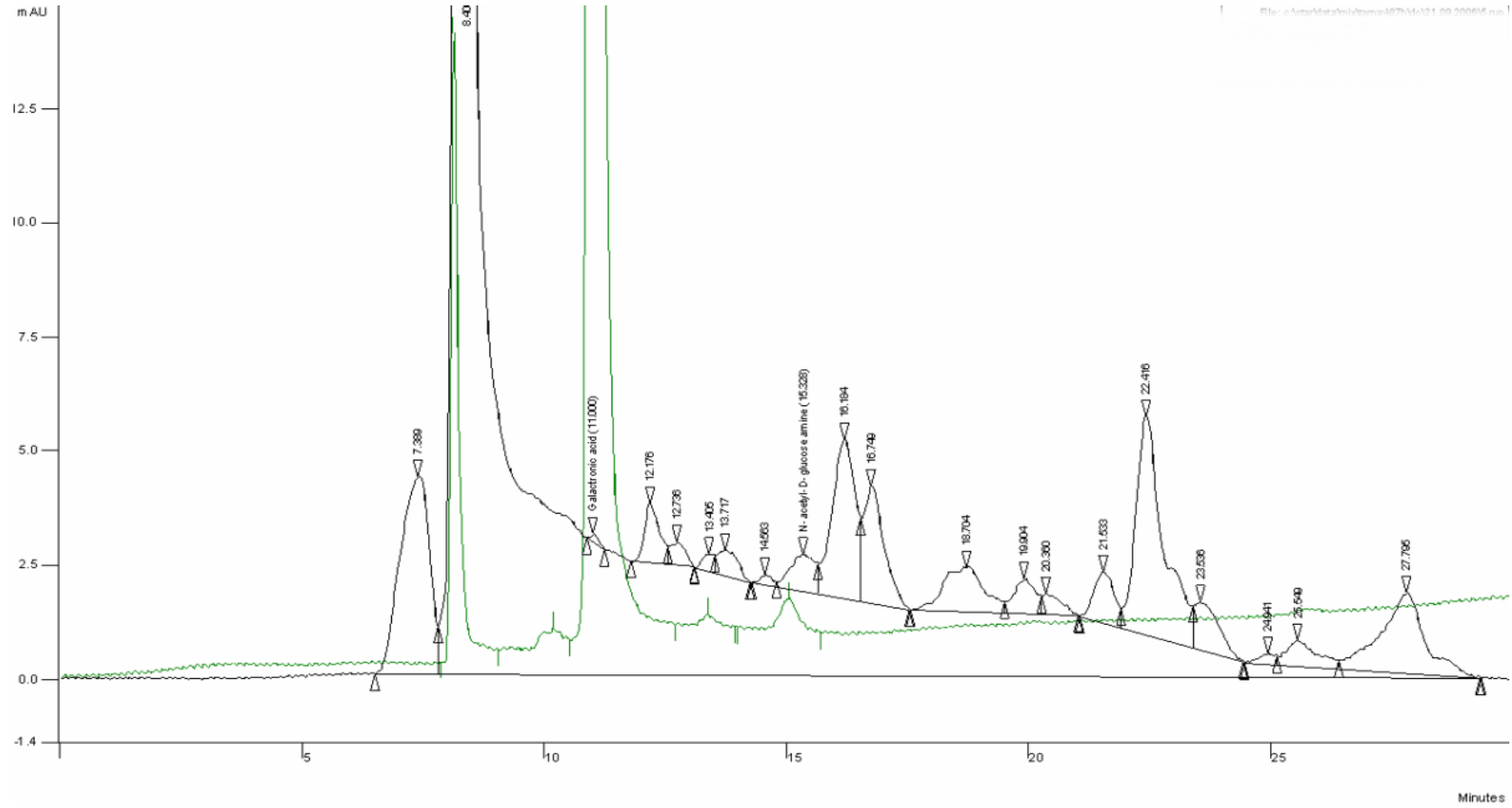
Şekil 4.16. *P. fluorescens* B5 suşunun benzen+MSM besiyortamında ürettiği EPS' nin şeker analiz kromotogramı



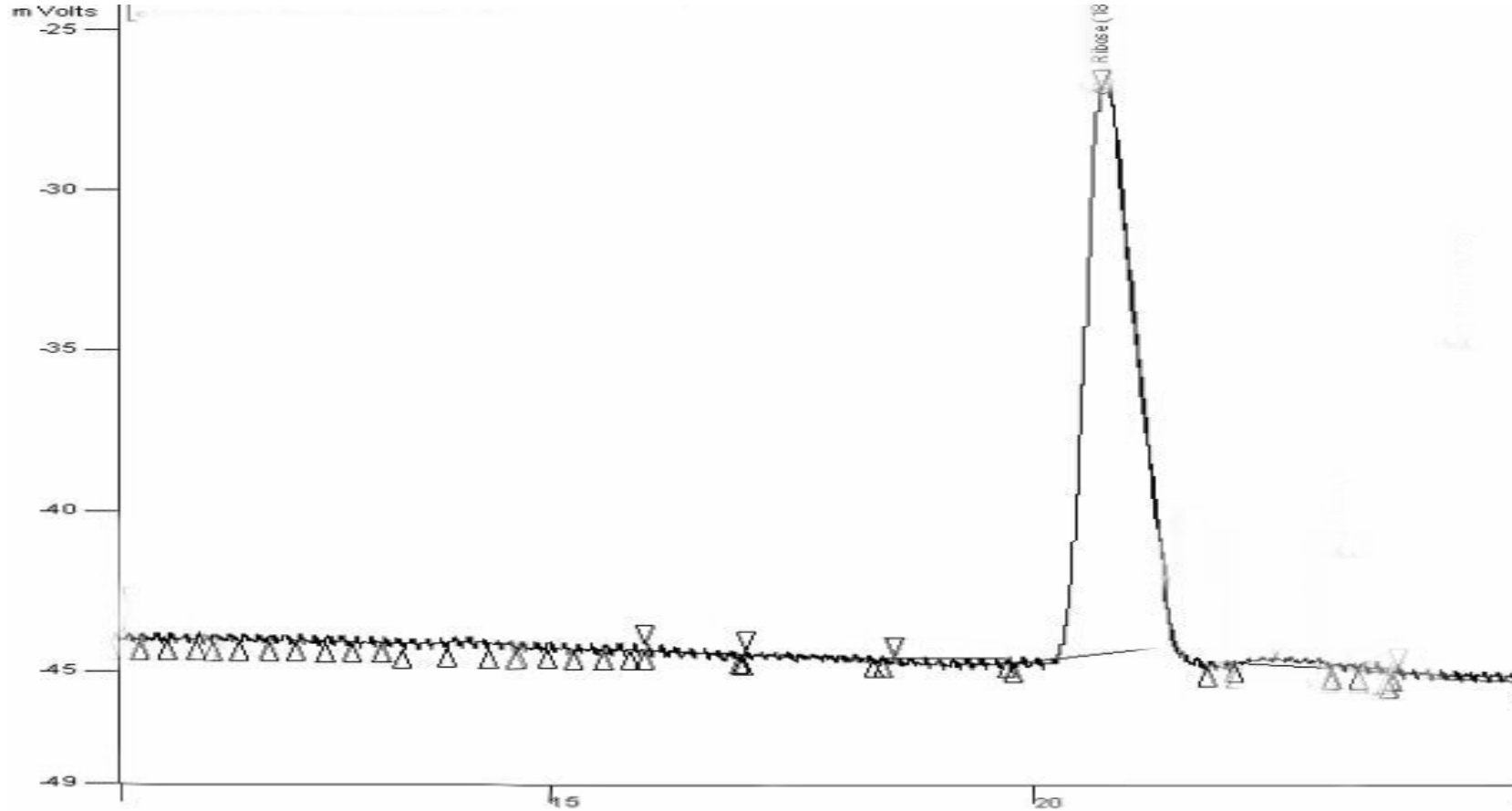
Şekil 4.17. *P. fluorescens* B5 suşunun benzen+MSM besiyortamında ürettiği EPS' nin asit analiz kromotogramı (siyah pik standart; pembe pik: örnek)



Şekil 4.18. *P. stutzeri* B11 suşunun NB besi ortamında ürettiği EPS' nin şeker analiz kromatogramı

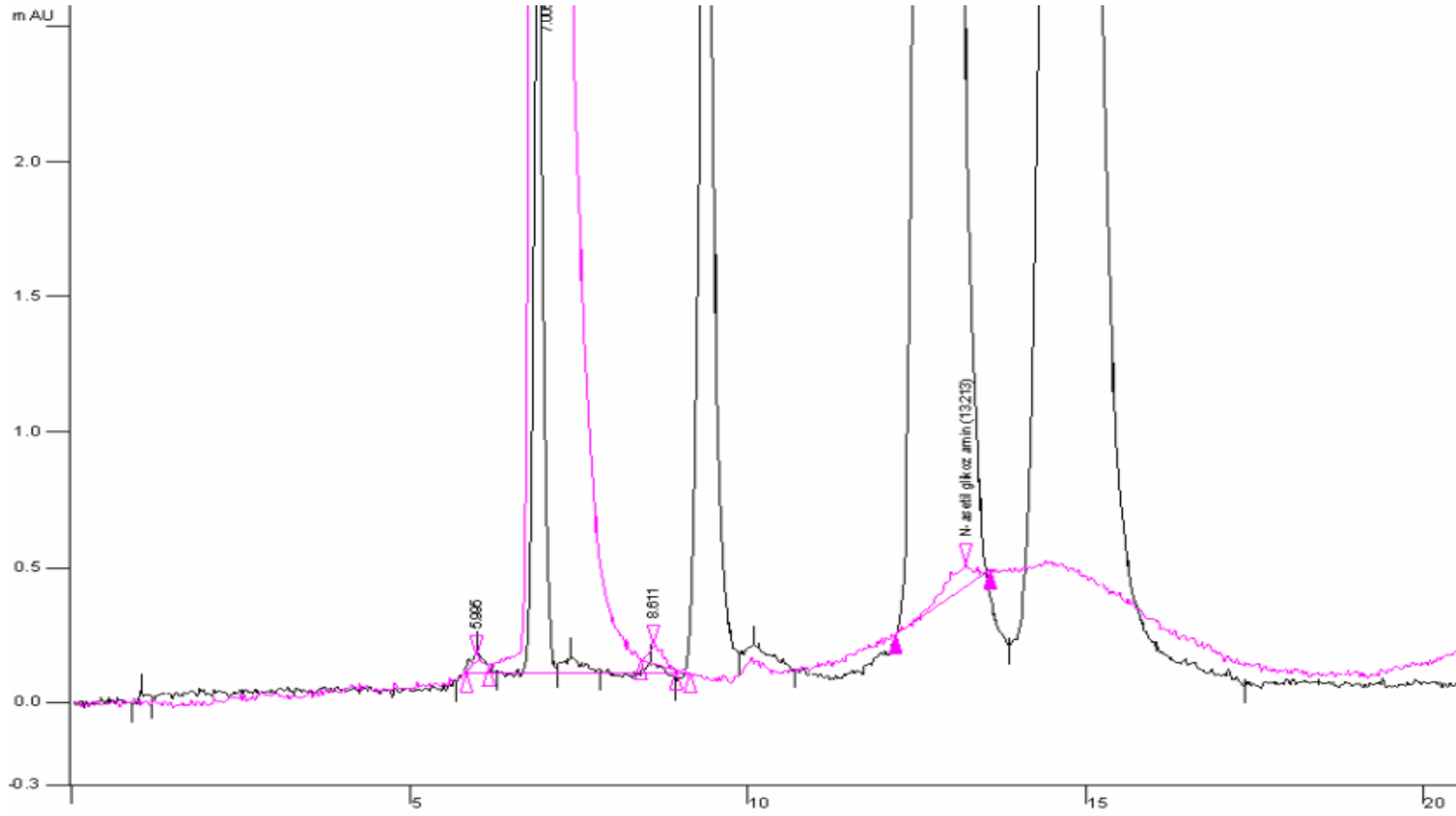


Şekil 4.19. *P. stutzeri* B11 suşunun NB besiortamında ürettiği EPS' nin asit analiz kromotogramı (siyah pik: standart, yeşil pik: örnek)

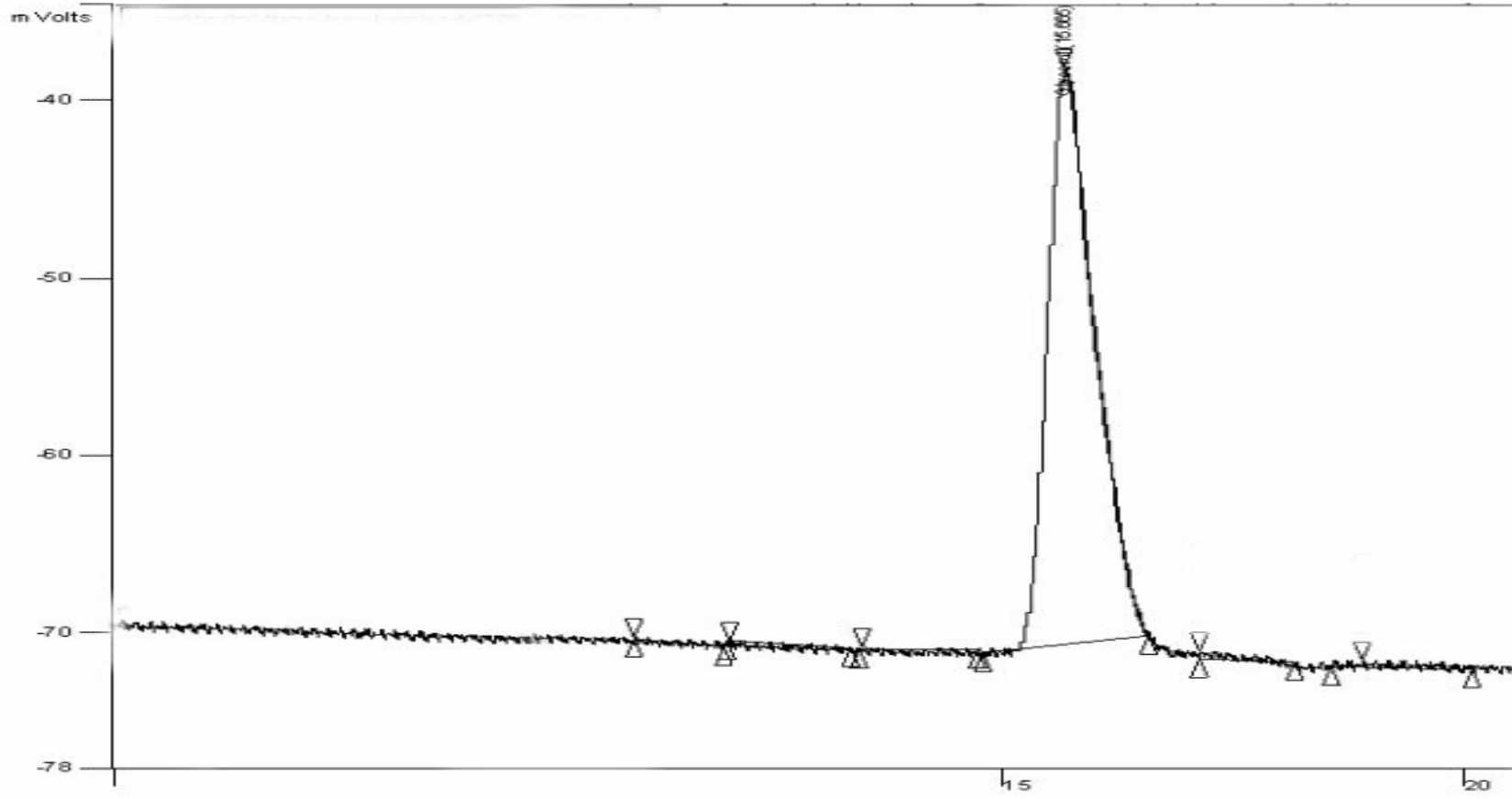


Şekil 4.20. *P. stutzeri* B11 suşunun BTX+MSM besiortamında ürettiği EPS' nin şeker analiz kromotogramı

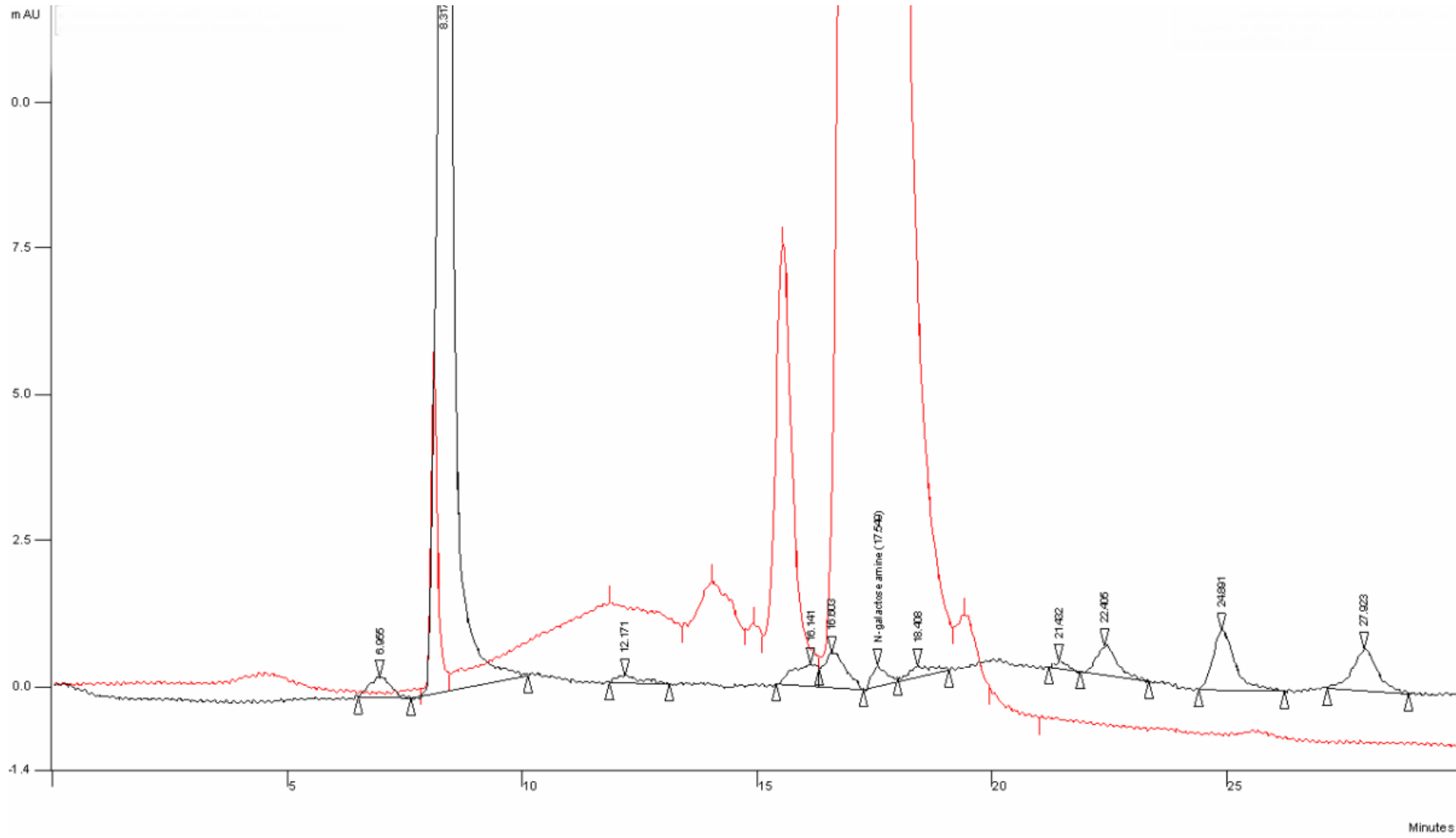




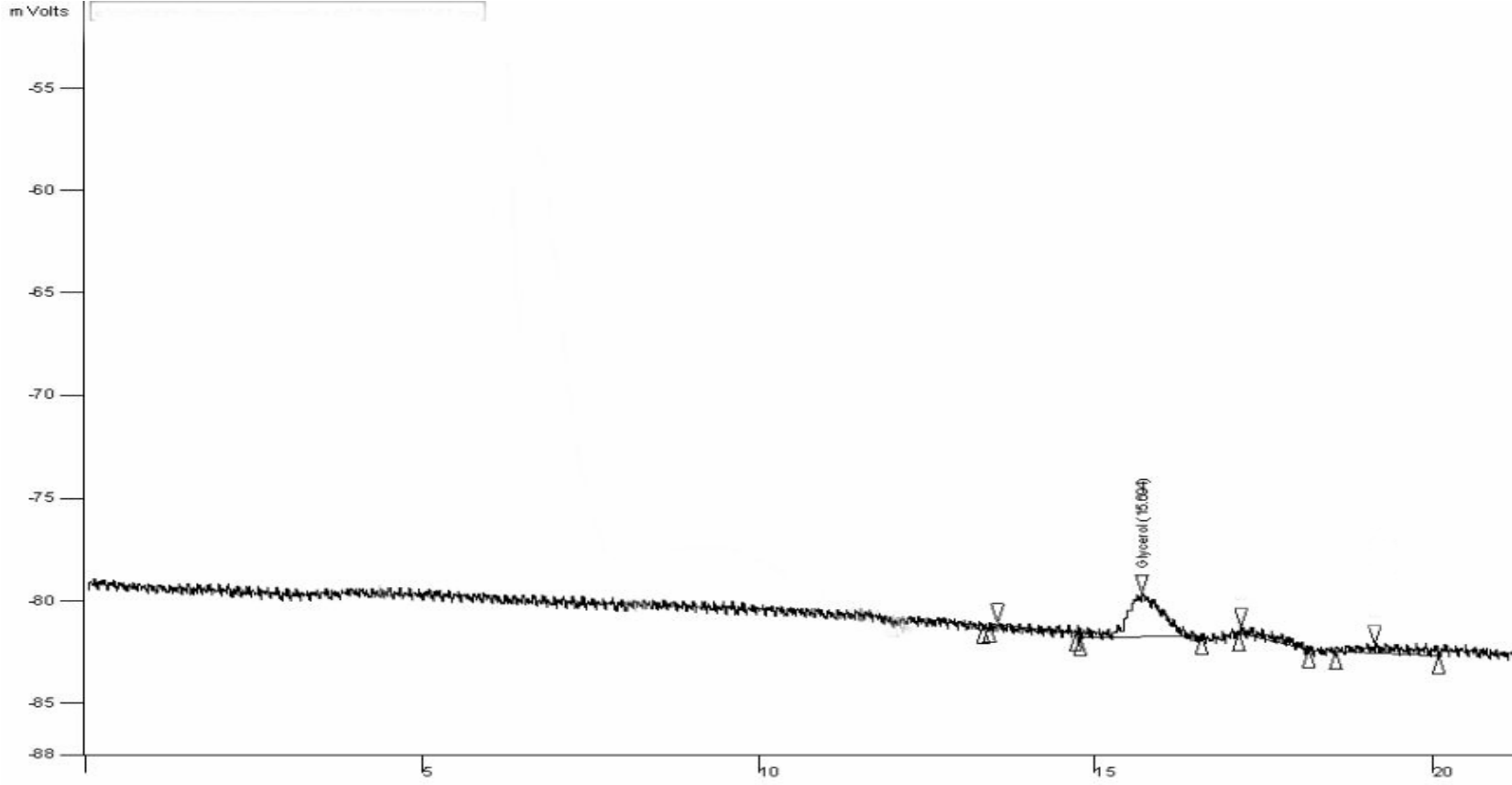
Şekil 4.21. *P. stutzeri* B11 suşunun BTX+MSM besiortamında ürettiği EPS' nin asit analiz kromotogramı (siyah pik: standart, pembe pik: örnek)



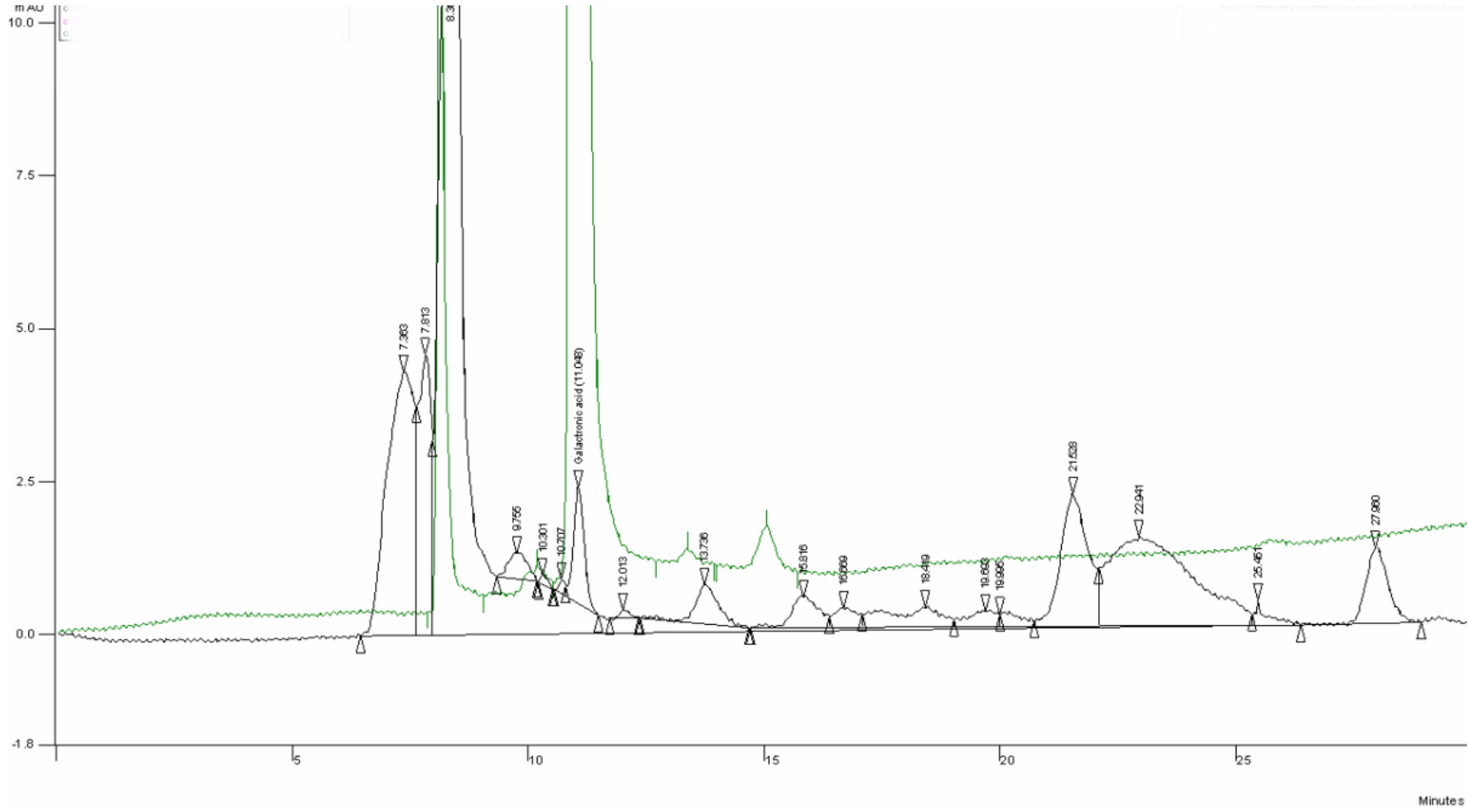
Şekil 4.22. *P. putida* B15 suşunun NB besi ortamında ürettiği EPS' nin şeker analiz kromatogramı



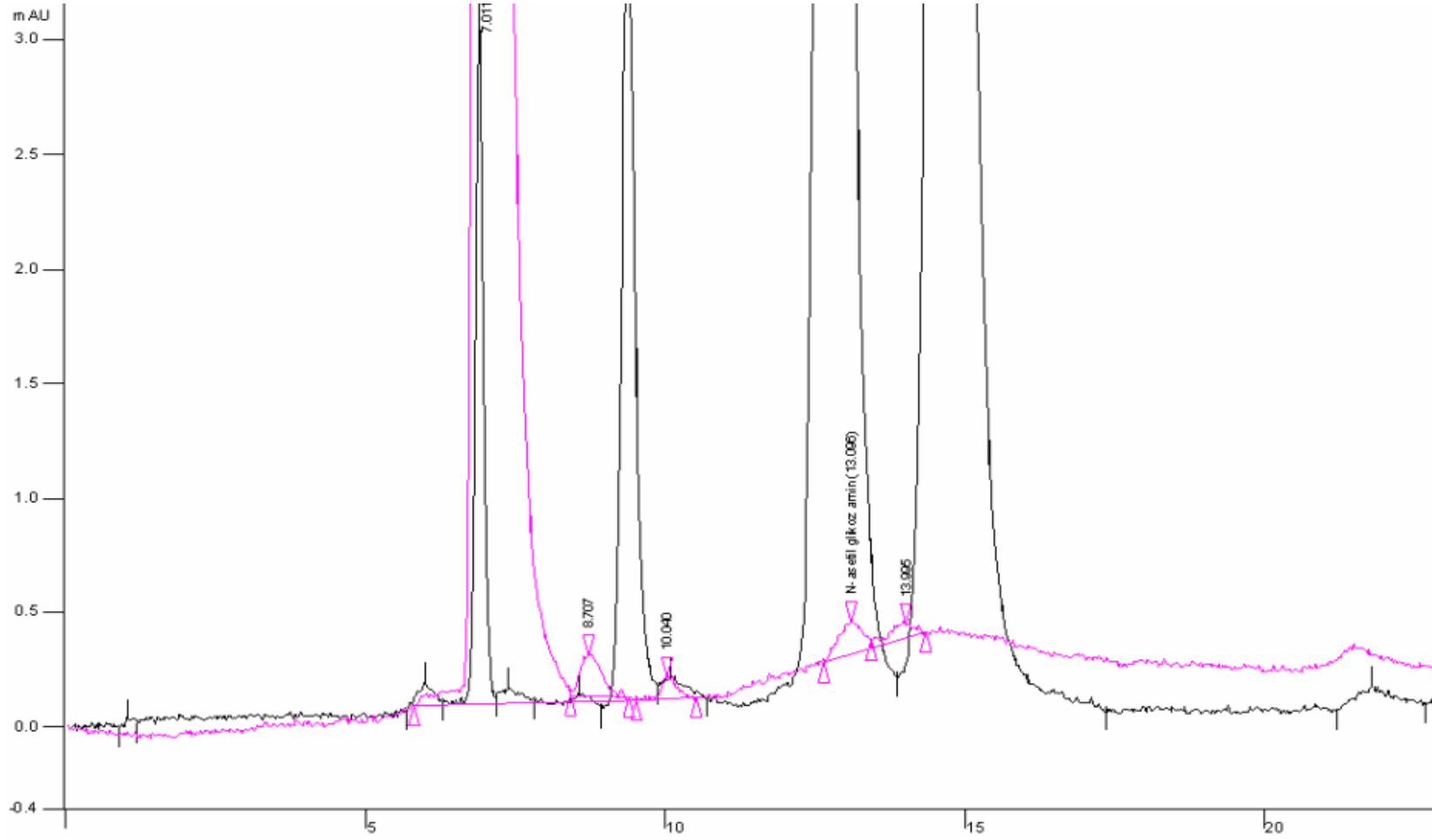
Şekil 4.23. *P. putida* B15 suşunun NB besiyortamında ürettiği EPS' nin asit analiz kromatogramı (pembe pik: standart, siyah pik: örnek)



Şekil 4.24. *P. putida* B15 suşunun benzin+MSM besiyortamında ürettiği EPS' nin şeker analiz kromotogramı



Şekil 4.25. *P. putida* B15 suşunun benzin+MSM besiortamında ürettiği EPS' nin asit analiz kromotogramı (yeşil pik: standart, siyah pik: örnek)



Şekil 4.26. *P. putida* B15 suşunun benzin+MSM besiortamında ürettiği EPS' nin asit analiz kromotogramı (Pembe pik: standart, siyah pik: örnek)

## 5. SONUÇ VE ÖNERİLER

*Pseudomonas* cinsi bakteriler, toprak, su, kanalizasyon, memeli bağırsakları ve bazı bitkiler gibi çok geniş bir yayılış alanına sahip olan ve farklı ortamlardan kolayca izole edilebilen gram negatif, basil mikroorganizmalardır [10, 11]. Çalışmada atık su ve toprak örneklerinden izole edilen toplam 20 adet *Pseudomonas* cinsine ait suşlar kullanılmıştır.

*Pseudomonas* cinsi bakterilerin bazı metabolitler (ekzopolisakkarit, piyosiyenin ve ramnolipid) ürettiği ve bu bakterilerin kirli alanlarda canlı kalabilme şansının tamamen ürettikleri ikincil metabolitlere bağlı olduğu bildirilmiştir [15, 16, 72, 121]. Endüstriyel amaçlı kullanılan bakterilerde aranan önemli özelliklerden biri yüksek ikincil metabolit üretimidir [22]. *Pseudomonas* türlerinin pigment üretimleri, çeşitli endüstriyel alanlarda kullanılan ikincil bir metabolit olarak bildirilmiştir [2, 15]. Pigmentlerin, *Pseudomonas* spp. tarafından koloniler etrafında kültür besiyeri içerisine salınarak üretildiği, onlara seçici bir özellik kazandırdığı ve bakteriyolojik tanıda önemlidir [21].

Bu araştırma da *Pseudomonas* spp. suşlarının farklı besiyerlerinde türe has pigment oluşumları belirlenmiştir. Çeşitli kaynaklara göre *P. aeruginosa* türlerinin piyosiyenin pigmenti [7], *P. fluorescens* türlerinin fluorescens pigmenti [27], *P. putida* türlerinin piyoverdin pigmenti [10, 21], *P. cepecia* türlerinin sarı-yeşil renkte [10, 23] ve *P. luteola* türlerinin sarımtırak renkte pigment [122] oluşturdukları, *P. stutzeri* türlerinin ise pigment oluşturmadıkları belirtilmiştir [21]. Yapılan çalışmada denemelerde kullanılan suşlardan *P. aeruginosa* B1, B2, B3, B16, B19, B20 suşlarının plaklarda mavi-yeşil renkte piyosiyenin, *P. fluorescens* B4, B5, B6, B7 suşlarının sarı-yeşil renkte fluoresens, *P. cepecia* B13, B14 suşlarının ise sarıyeşil renkte pigment oluşturdukları, *P. putida* B12, B15, B18, *P. stutzeri* B8, B9, B10, B11 ve *P. luteola* B17 suşlarının ise plakta sarımtırak koloniler oluşturmaları sebebi ile *P. putida*, *P. stutzeri* ve *P. luteola* suşlarında pigment oluşumunun gözlenmediği ifade edilmiştir (Çizelge 4.1). Yukarıdaki kaynaklara ile mukayese edildiğinde, *P. putida*' ya ait suşlarının (B12, B15 ve B18) piyoverdin, *P. luteola*' ya ait suşun (B17)

sarımtırak bir pigment oluşturduğu, *P. stutzeri* (B8, B9, B10, B11) suşlarının ise pigment oluşturmadığı söylenebilir. Diğer yandan bu çalışmada suşların kullanılan 6 farklı besiyortamı (Pseudomonas Agar Gliserollü, Pseudomonas Agar, King's B, Muller Hinton Agar, Pseudomonas Agar- P, Pseudomonas Agar Base CN Selective Supplement) içerisinde en iyi Pseudomonas Agar Base CN Supplement besiyortamında pigmentasyon gösterdiği tespit edilmiştir (Çizelge 4.1). Bazı araştırmacılara göre, pigment üretiminin artmasında pepton, mineraller ve çeşitli iyonları içeren besiyeri kompozisyonunun rol oynadığı özellikle magnezyum, potasyum, fosfat ve sülfatların besiyerinin içeriğine katıldığında pigment üretimini artırdığı belirtilmiştir [122, 123, 124]. Kodaka ve ark. (2003) *P. aeruginosa'* nın pigment üretiminin artırılmasına yönelik farklı besiyerleri denemişler ve kullandıkları bu besiyerlerinde en iyi pigmentasyonun setrimit, kanamisin ve nalidiksik asit içeren yeni bir agar (CKNA) besiyortamında gözlemlemişlerdir [125]. Çalışmada Pseudomonas Agar Base CN Supplement besiyortamının *Pseudomonas* spp. suşlarının pigment oluşumlarını diğer besiyortamlarına göre daha fazla stimüle etmesinin içeriğinde bulunan potasyum sülfat, magnezyum klorür, setrimit ve sodyum nalidiksik asit gibi maddelerden kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Son yıllarda, sürekli olarak, etki alanı geniş ve güçlü antibiyotikler üreten, yeni mikroorganizma tiplerinin araştırılması önem kazanmıştır [16]. Bu nedenle, fluoresens *Pseudomonas* spp.' ler tarafından üretilen pigmentlerin antibiyotik aktiviteleri araştırılmıştır. *Pseudomonas* spp.' lerden antibiyotiklerin pratik kullanımı ilk olarak enzimatik aktivite gösteren Piyosiyanz olarak isimlendirilen bir ilacın varlığıyla bildirilmiştir. Bu ilaç diftera, influenza ve menenjit tedavisinde kullanılmıştır. Fakat bugün klinik kullanımı bırakılmıştır. *Pseudomonas* spp.' lerden elde edilen antimikrobiyal maddelerin sadece iki tanesi tıbbi olarak faydalı bulunarak (piyosiyanın ve piyrolnitrin) ticari olarak üretilmektedir [25]. Bu amaçla son yıllarda *Pseudomonas* spp.' lerden piyosiyanın üretimi bir çok araştırmacının ilgisini çekmekte ve bu çalışmalar fluoresens *Pseudomonas* spp.' lerin temsilcilerinden özellikle de besiyeri içerisinde mavi-yeşil piyosiyanın pigmentini üreten *P. aeruginosa* ile yürütülmektedir [22]. Bu nedenle bu çalışmada kullanılan *Pseudomonas* spp. suşları arasından sadece *P. aeruginosa* suşlarının ürettikleri, endüstriyel açıdan önemli



ikincil bir metabolit olan piyosiyenin pigmenti üretim kapasiteleri araştırılmış ve suşlarının piyosiyenin üretim miktarlarının spektrofotometrik olarak 10,10-2,11 µg/mL arasında olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.2). Essar ve ark. (1990) *P. aeruginosa* PAO1 ve bu suşun mutantlarında piyosiyenin üretimini spektrofotometrik olarak belirlemiştir. Kültürlerin piyosiyenin miktarını mililitrede mikrogram olarak bildirmişler ve buna göre bu suşların piyosiyenin miktarını *P. aeruginosa* PAO1 6,30 µg/mL, *P. aeruginosa* PADE E1 5,44 µg/mL, *P. aeruginosa* PADE A47 2,13 µg/mL, *P. aeruginosa* PADE A48 1,45 µg/mL ve *P. aeruginosa* PADE A47E1 0,02 µg/mL olarak bulmuşlardır [7]. Bu araştırma ile mukayese edildiğinde çalışmada ki suşların piyosiyenin üretimlerinin daha yüksek olduğu tespit edilmiştir.

Biyoteknolojik uygulamalarda önemli olabilecek bu metabolitin yanı sıra, son yıllarda mikrobiyal ekzopolisakkaritlerde bir çok alanda kullanılmaktadır. Mikrobiyal ekzopolisakkaritler, gıda ve ilaç endüstrisinde ve mikrobiyolojik besiyerlerini katılaştırmak için ticari hale getirilmişlerdir. Ticari mikrobiyal üretim için sadece birkaç polisakkarit yoğun olarak çalışılmıştır: *Leuconostoc* sp. tarafından üretilen dekstran, *Xanthomonas compestris* ' den ksantan gum, *Azotobacter vinelandii* ve *Pseudomonas* spp. tarafından üretilen alginik asit' dir [56]. Toprak, deniz, tatlı su gibi farklı çevresel örneklerden izole edilen, *Pseudomonas* spp.' lerin EPS ürettikleri bilinmektedir [37]. Bu bakımdan son yıllarda biyoteknolojide geniş uygulama alanlarına sahip olan EPS üretimi [51] bir çok araştırmacının dikkatini çekmiştir. Fett ve ark. (1995) *P. fluorescens* ve *P. putida* suşlarında EPS üretimini sırasıyla 30-79 mg/L ve 25-58 mg/L olarak bildirmişlerdir [126]. Bu araştırma ile karşılaştığımız zaman çalışmada kullanılan *P. fluorescens* suşlarının EPS üretimlerinin düşük (45-67 mg/L), *P. putida* suşlarının ise EPS üretimlerinin (37-67 mg/L) yüksek olduğu belirlenmiştir. Osman ve ark. (1986) karbon kaynağı olarak sükröz içeren yarı sentetik besiyerinde *P. syringae* 2159 ve K1 suşları tarafından EPS üretim miktarlarını sırasıyla 287 ve 80 mg/L olarak bulmuşlardır [127]. Bu kaynak ile çalışmada ki diğer suşların EPS üretimlerini kıyasladığımızda, *Pseudomonas* spp. suşlarının ürettiği EPS üretimlerinin daha düşük (22-75 mg/L) olduğu belirlenmiştir. Besiyerinin kompozisyonu (karbon ve nitrojen kaynakları) ve inkübasyon şartları

(sıcaklık, pH, zaman) gibi bir çok faktörün, EPS üretimini ve özelliklerini etkilediği bilinmektedir (128-130). Bu kaynaktaki EPS üretiminin çalışmadaki suşların ürettikleri EPS miktarından fazla olmasının sebebinin besiyeri kompozisyonu, pH, sıcaklık gibi bir takım faktörlere bağlı olduğu düşünülmektedir.

*Pseudomonas* cinsi bakterilerin ürettiği bir diğer ikincil metabolit olan ramnolipidler de biyoteknolojik açıdan önemli bir çok alanda (gıda sanayi, tıp, kozmetik, çevre teknolojileri, tarım gibi) kullanılmaktadır. Ramnolipid biyosümfektanları hücre duvarının yapısında buldukları zaman hidrokarbonlu bileşikleri periplazmik yüzeye penetrasyonunu kolaylaştırmaları, ekstraselular olarak salındıklarında ise hidrokarbonlu bileşikleri emülsifiye etmeleri ile özellikle çevre kirliliğinin kontrolünde önemli rol alan biyosümfektanlardır [65]. Mikroorganizmalar tarafından üretilen biyosümfektanlar bileşiklerin parçalanması ve emülsifikasyonu artırmaya yardım eder. Biyoemülsifiyerler ticari olarak petrolle kirlenmiş toprak ve suların biyoremediasyonunda, petrol iyileşimini artırmaya yönelik, petrolle kirlili boruların temizlenmesi için kullanılan klorlu çözücülerin yerine kullanılabilir [66]. Sıdal ve ark. (2000) zeytinyağı fabrikasından izole ettikleri 8 adet *Pseudomonas* sp. suşlarının ramnolipid üretimlerinin 423-460 mg/L arasında olduğunu tespit etmişlerdir [131]. Araştırmada *Pseudomonas* spp. suşlarının ramnolipid üretimlerinin 219-521 mg/L arasında olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.4). Sıdal ve ark. (2000) yapmış olduğu çalışma ile araştırmadaki suşlar mukayese edildiğinde, *P. aeruginosa* B19 (521 mg/L), *P. aeruginosa* B20 (467 mg/L) ve *P. cepecia* B13 (474 mg/L) suşların ramnolipid üretimlerinin yüksek olduğu, diğer suşların ise ramnolipid üretimlerinin düşük olduğu söylenebilir. Yüksek ramnolipid üreten *P. aeruginosa* B19 (521 mg/L), *P. aeruginosa* B20 (467 mg/L) suşlarının piyosiyanın üretimlerinin de yüksek olduğu (sırasıyla 10,10 µg/mL ve 9,81 µg/mL), ramnolipid üretimi düşük olan *P. aeruginosa* B16 suşunun (347 mg/mL) piyosiyanın üretiminde de (2,11 µg/mL) düşük olduğu dikkati çekmektedir (Çizelge 4.2, Çizelge 4.4). Çalışma da Person's korelasyon testine göre *P. aeruginosa* suşlarının piyosiyanın üretim miktarı ile ramnolipid üretimleri arasında bir ilişki olup olmadığı araştırılmış ve  $p=0,823$  bulunmuştur. Bu değere göre piyosiyanın üretim miktarı ve ramnolipid üretiminin arasındaki ilişkinin  $\alpha=0,05$  düzeyinde önemli olduğu anlaşılmıştır (Çizelge 4.5). Literatür araştırmaları

sonucunda *P. aeruginosa* suşlarının piyosiyanın üretimleri ve ramnolipid üretimlerinin arasında herhangi bir ilişkiye rastlanılmamıştır.

*Pseudomonas* cinsi bakterilerin özellikle çevre kirliliği bakımından ciddi risk teşkil eden kirlenici faktörleri önemli oranda degradasyon özelliği göstermesi ve özellikle toprakta yaygın olarak bulunması bu bakterilerin toprağın doğal yolla temizlenmesinde de rol alması çevre biyoteknolojisine yönelik araştırmalarda tercih edilme sebeplerinden biridir. Ancak bunun yanı sıra bu özelliğinden yararlanarak biyoteknolojik önemi olan metabolitlerin üretiminde de biyoteknoloji alanındaki araştırmalara yeni bir boyut getireceği düşünülmektedir. Çalışmada önemli ölçüde çevre kirliliğine yol açan, tarımda ve petrol endüstrilerinde sıklıkla kullanılan, benzin ve diğer yakıtlarda bulunan, çevrede kalıcı, aynı zamanda hareketli olan, karasal ve deniz ekosisteminde biriken, çok küçük derişimlerinde bile kanserojen olan [132, 133] organik bileşiklerin (2,4-D, Benzin, BTX ve Benzen), organik kirlenicilerle (petrol ve türevleri, herbisitler, pestisitler v.s.) kirlenmiş alanların mikrobiyolojik biyodegradasyonunda özellikle tercih edilen [96, 134-136] *Pseudomonas* spp. suşları ile biyodegradasyonu ve kirlilik yaratan bileşiklerin biyodegradasyonu esnasında bu suşların ürettikleri bazı ikincil metabolitler (EPS, piyosiyanın ve ramnolipid) [16] araştırılmıştır.

Modern dünyada endüstriyel kimyasallarla toprak ve suların kirlenmesi sıkıntı verici ciddi bir problem haline gelmiştir. Organik kirleniciler, su ve karasal ekosistemlerin büyük bir kısmında görülen çevresel kirlenicilerdir ve insanlar tarafından üretilen bu organik bileşiklerin bir çoğu çevrede ciddi sağlık problemlerine yol açmaktadır. Bu toksik organik kirlenicilerin ortadan kaldırılması için biyoremediasyon teknolojilerinin kullanımı ise klasik fiziksel ve kimyasal metotlara güvenilir ve ekonomik bir alternatif sağlamaktadır [137, 138].

Tarım ve endüstriyel alanlarda yaygın olarak kullanılan organik kimyasalların canlılar üzerine toksik stresi hakkında tatmin edici bilgiler mevcut değildir. Bu amaçla, son yıllarda su ve karasal alanlardaki canlılar üzerine toksik testler yapılmaktadır. Böylece bu testler, toksik bileşiklerin canlılar üzerine yaptığı etkiyi

belirlemeye yönelik ön araştırmalar için tavsiye edilmektedir [139]. Bu çalışmada, denemelerde kullanılan suşlar üzerine organik kirleticilerin (2,4-D, Benzin, BTX ve Benzen) etkileri Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu (MİK) değerleri ile belirlenmiştir. Araştırmada kullanılan farklı organik bileşiklerin suşları inhibe ettiği konsantrasyonlar tespit edilmiş ve bu bileşiklerin *Pseudomonas* spp. suşları üzerine değişik derecelerde etkili olduğu görülmüştür (izelge 4.6). Genel olarak sonuçlara baktığımızda, çalışmada kullanılan organik bileşiklerden BTX ve benzinin denemelerde kullanılan suşlar üzerine benzen ve 2,4-D' ye göre daha etkili olduğu tespit edilmiştir. Bu yüzden çalışmada benzen ve 2,4-D' ye dirençli olan suşların bu bileşikleri, BTX ve benzine göre degradasyon kabiliyetininin de daha çok olacağı ve bu bakımdan suşların 2,4-D herbisiti ve benzen hidrokarbonlarıyla kirli doğal çevrelerde bulunan diğer mikroorganizmalara oranla daha üstün olabileceği söylenebilir. Bunun yanı sıra kirletici organik bileşiklerin çalışmada kullanılan bakteriler üzerine MİK' leri tespit edilerek denemelerde kullanılacak uygun konsantrasyonların belirlenmesi düşünülmüştür. Babu ve ark. (1995) endüstriyel atıklardan izole ettikleri *P. marginalis*' in organik nitriller ve amidlerin degradasyon kapasitesini araştırarak, *P. marginalis* için farklı nitriller ve amitlerin minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) değerlerini 5-300 mM arasında bulmuşlardır. Bu bakterinin yüksek moleküler ağırlıklı nitril bileşiklerine dirençli olduğunu ve bu bileşikleri degrede edebileceğini bildirmişlerdir [140].

Herbisitler gibi klorlu organik kimyasalların büyük bir kısmı tarımsal alanlarda kullanılmaktadır. Son 50 yıldır zirai alanda yaygın bir kullanım alanına sahip olan 2,4-D rekalsitrant bir bileşik olmasına karşın, toprak mikroorganizmaları tarafından özellikle de *Pseudomonas* spp.' lar tarafından parçalanma eğiliminde olan kirletici bir ajandır [135, 141, 142].

Atlas, (1981) *Pseudomonas* cinsi üyelerinin organik bileşikleri degrede edebildiklerini, organik bileşiklerin maksimum biyodegradasyonunda saf kültürden ziyade karışık kültürlerde etkili olduğunu, ayrıca pH (7,0-7,5) ve sıcaklığın (30-37 C) biyodegradasyonda önemli olduğunu bildirmiştir [143]. Çeşitli çalışmalarda, karbon ve enerji kaynağı olarak zararlı bileşikleri kullanan mikroorganizmaların

mikrobiyal degradasyonunda, minimum değerlerde çinko, kalsiyum, manganez, magnezyum, demir, sodyum ve sülfürün yanısıra nitrojen, fosfor ve potasyumun bulunduğu ortamlarda da optimum mikrobiyolojik büyümenin gerçekleştiği bildirilmiştir [77]. Bu çalışmada karbon ve enerji kaynağı olarak çeşitli konsantrasyonlarda kullanılan organik kirleticilerin (2,4-D, benzin, BTX ve benzen) saf *Pseudomonas* spp. kültürleri tarafından biyodegradasyon denemeleri, suşların ihtiyaç duyduğu nitrojen, sülfür ve eser elementleri (çinko, demir, manganez gibi) içeren Mineral Salt Media (MSM) besiyortamı kullanılarak, sabit sıcaklık ve sabit karıştırma hızındaki (pH 7,0±0,2 ve 37 °C' de 100 rpm) orbital çalkalayıcıda gerçekleştirilmiştir. Bu denemede gelişim gösteren suşlar, geliştirildikleri MSM besiyerindeki karbon kaynağı olarak ilave edilmiş olan organik kirleticiyi kullanabildiği düşünülmüş ve buna göre iyi gelişim gösteren suşlar bir sonraki denemeler için bu özelliği esas alınarak seçilmiştir. Aynı şekilde araştırmacı Soulas (1982)' de 2,4-D degradasyonunun mikrobiyal aktivitenin bir sonucu olduğunu, onun miktarı ile mikrobiyal gelişme ve biyomas değişimleri arasında bir ilişki olduğunu belirtmiştir [144]. Cullimore (1981) 2,4-D' nin yıkımını belirleyen en önemli faktörlerin mikroorganizma yoğunluğu ve 2,4-D' yi metabolize edecek enzim sistemlerinin varlığını bildirmiştir [145].

2,4-D herbisitinin degradasyonunun kantitatif tayinine dair yapılan bir çok çalışmada UV spektrofotometrik ölçümleri ve High-Pressure Liquid Kromatografisi (HPLC) kullanılmıştır [120, 146]. Oh ve Tuovinen (1990) topraktan elde ettikleri karışık bir bakteri kültürü kullanarak MSM besiyerinde 2,4-D degradasyonu üzerinde durmuşlar ve kalan 2,4-D miktarını HPLC ve UV spektrofotometresi yöntemleri ile belirlemişlerdir. 2,4-D' yi tek karbon ve enerji kaynağı olarak kullanabilen tüm bakteri izolatlarının Gram (-) basiller olduğu görülmüştür. Ayrıca 2,4-D' ye ek olarak diğer bir karbon kaynağının da kullanılıp kullanılmadığı denenmiş ve bunun için ortama glikoz (500-1000 mg/L) eklenmiştir. Test ortamında, bakteri kültürünün büyümesi spektrofotometrede 550 nm' de absorbans değerleri okunarak belirlenmiştir. Ortamda glikoz varlığında degradasyon oranında bir artış görülmediği halde daha hızlı ve zengin bir büyüme görülmüştür. Ancak, glikoz içermeyen mineral tuz ortamında 2,4-D degradasyonu çok daha kısa sürede tamamlanmıştır [120].

Khalil (2003) topraktan 2,4-D herbisitini degrades eden 7 adet bakteri izole etmiştir. Bu bakteriler arasında minimal besiyortamında 2,4-D' yi en iyi degrades eden bakterinin en muhtemel sayım yöntemi (MPN=most possible number) ile *P. putida* olduğunu ve bu bakterinin minimal besiyortamında pH 6,5 ve 30 °C' de 2,4-D' yi biyodegradasyonunu HPLC analizi ile belirlemiştir. *P. putida*' nın 500 ppm' lik 2,4-D' yi 45 saat içinde tamamıyla degrades ettiğini bildirmiştir [135].

Araştırmada kullanılan 2,4-D herbisitinin karbon ve enerji kaynağı olarak kullanılıp kullanılmadığı, ortamdaki *Pseudomonas* spp. suşlarının zamana göre (24, 48 72 ve 96 saat) hücre yoğunluğunun artışı ile, spektrofotometrik (600 nm) olarak belirlenmiştir. *Pseudomonas* spp. suşlarının 2,4-D herbisitindeki gelişim durumları bir haftaya kadar denenmiş fakat bir değişiklik gözlenemediği için ilk dört günlük bakteriyal gelişimleri esas alınarak değerlendirilmiştir. Tek karbon ve enerji kaynağı olarak 2,4-D herbisiti bulunan MSM besiyortamında dört gün spektrofotometrik (600 nm) olarak belirlenen canlı mikroorganizma sayısında artış saptanan suşlar degradesyon yeteneğine sahip mikroorganizmalar olarak tanımlanmıştır. Bu amaçla 2,4-D herbisitinde en iyi gelişen suşun *P. aeruginosa* B1 olduğu spektrofotometrik olarak tespit edilmiştir (Çizelge 4.7). Çalışmada UV spektrofotometrik ölçümlerin sonucunda 2,4-D' de en iyi gelişen *P. aeruginosa* B1 suşunun ortamdaki 2,4-D' yi karbon kaynağı olarak kullanıp kullanmadığı, zamana karşı bu bileşiğin miktarlarındaki azalma HPLC analizi ile belirlenmiştir. Buna göre *P. aeruginosa* B1 suşunun 50 ppm' lik 2,4-D' yi 24. saatte % 24' ünü, 48. saatte % 31' ini, 72. saatte % 32' sini ve 96. saatte ise % 33' ünü degrades ettiği tespit edilmiştir (Çizelge 4.15). 2,4-D herbisitini karbon kaynağı olarak kullanabilen *P. aeruginosa* B1 suşunun spektrofotometrik ölçümlerinde gelişimin 24. saatte gerçekleştiği sonra sabit kaldığı, 2,4-D' nin tamamını parçalayamadığı için gelişiminde çok yüksek olmadığı HPLC sonuçlarını doğrulamaktadır. Musarrat ve ark. (2000), topraktan izole ettikleri *P. aeruginosa* NJ 10 ve NJ 15 suşlarının 2,4-D' yi degradesyon yeteneklerini araştırmışlardır. Bu amaçla, MSM besiyortamında 2,4-D' de suşların gelişimini 600 nm' de spektrofotometrik olarak belirlemişlerdir. HPLC analizi ile, bu iki suşun 2,4-D' yi 20 günde % 96,6 ve 99,8 oranında degrades ettiğini, bakteri gelişimiyle orantılı olduğunu ve bu suşların degradesyonda kullanılabileceğini bildirmişlerdir [147].

Çalışmada, *P. aeruginosa* B1 suşu, toprakta uzun süre bozunmadan kalabilen ve canlılar üzerine toksik etkilere sahip olan 2,4-D herbisitini 96 saat gibi kısa bir sürede % 33' ünü degrades ederken, Musarrat ve ark. (2000) topraktan izole ettikleri *P. aeruginosa* NJ 10 ve NJ 15 suşlarının 2,4-D' yi 20 gün gibi uzun bir sürede % 96,6 ve 99,8 oranında degrades ettiği görülmektedir [147]. Bu bakımdan, *P. aeruginosa* B1 suşunun 2,4-D herbisitinin yarattığı kirliliğinin giderilmesinde (biyoremediasyonunda) kullanılabilirliği düşünülmektedir.

Yapılan çalışmada 2,4-D' yi karbon kaynağı olarak kullanıp degrades eden *Pseudomonas* spp. suşlarının piyosiyanın üretimleri araştırılmış ve en yüksek piyosiyanın üretiminin 72. saatte *P. aeruginosa* B1 (4,1 µg/mL) suşu tarafından bakteriyal gelişimin durgun fazında gerçekleştiği tespit edilmiştir (Çizelge 4.9, Çizelge 4.10, Şekil 4.1). *Pseudomonas* spp. suşlarının 2,4-D' yi karbon kaynağı olarak kullanıp degradesyonu esnasında piyosiyanın üretimi ile ilgili herhangi bir literatür bilgisine rastlanılmamıştır.

Son yıllardaki çalışmalarda EPS-üreten bakteriler tarafından çevreden tarımla ilgili kimyasallar (herbisit) ve metaller gibi farklı organik kirleticilerin ortadan kaldırılmasında EPS üreten bakterilerin çevreden besin biriktirme özellikleri olduğu bulunmuştur [148]. Wolfaardt ve ark., (1994) yaptıkları çalışmada biofilm oluşturan mikroorganizmaların, klorlu bir herbisit olan 2,4-D (2,4-diklorofenoksi)' yi ekzopolimerleriyle absorbe ederek biriktirdiklerini [149], ve alınan bu 2,4-D (diclofob)' yi, besine ihtiyaç duyulduğu durumlarda metabolize ettiklerini bildirmişlerdir [150]. Çalışmada minimal besi ortamında karbon kaynağı olarak 2,4-D' yi kullanan *Pseudomonas* spp. suşlarının belli zaman aralıklarında (24, 48, 72 ve 96. saat) EPS üretimleri araştırılmış ve en yüksek EPS üretimlerinin 72. saatte *P. aeruginosa* B1 (40 mg/L) suşu tarafından, bakteriyal gelişimlerinin durgun fazında olduğu tespit edilmiştir. Çalışmadaki *Pseudomonas* spp. suşlarının 2,4-D' deki bakteriyal gelişimi ve EPS üretimi arasındaki ilişki Pearson's korelasyonuna göre belirlenmiştir. *Pseudomonas* spp. suşlarının 2,4-D herbisitinde 24, 48 ve 72. saatlerde bakteriyal gelişim ve EPS üretimi arasında  $\alpha = 0,01$  anlamlılık düzeyinde pozitif bir korelasyon olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.13).

Nichols ve ark. (2005)' larının yaptıkları çalışmada soğuk deniz izolatu *Pseudoalteromonas* CAM025' in yüksek tuzlu ve düşük sıcaklıklar gibi ekstrem koşullarda ekzopolisakkarit üreterek çevredeki strese karşı bu bakterileri koruduğunu, EPS üretiminin besiortamı kompozisyonu, pH, sıcaklık ve bakteriyal gelişim ile etkilendiğini, EPS üretiminin bakteriyal gelişimin durgun fazında gerçekleştiğini ve karbon kaynaklarına bağlı olarak EPS' nin miktarı ve monomer yapısındaki farklılığı vurgulamışlardır [151]. Nichols ve ark. (2005)' larının yaptıkları araştırmaya benzer olarak, çalışmada 2,4-D herbisitinde yüksek gelişim gösteren ve yüksek EPS üreten *P. aeruginosa* B1 suşunun farklı karbon kaynaklarında (nurtient broth ve 2,4-D+MSM besiortamlarında) ürettikleri EPS' nin monomer analizlerinin farklı olduğu ve bu suşun NB besiortamında ki şeker kompozisyonunun % 31 glikoz, % 69 gliserol ve 2,4-D+MSM besiortamında ki şeker kompozisyonunun ise % 70 gliserol, % 30 N-Asetil-D-Glikoz Amin içerdiği tespit edilmiştir (Çizelge 4.16).

2,4-D herbisitini kullanabilen *Pseudomonas* spp. suşlarının belli zaman aralıklarındaki (24, 48, 72 ve 96. saat) degradasyonu esnasında en yüksek ramnolipid biyosürefektan üretimi *P. aeruginosa* B1 (45 mg/L) suşu tarafından 72. saatte bakteriyal gelişimin durgun fazında olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.6). Bu suşun 2,4-D herbisitindeki bakteri üremesi ve biyosürefektan sentezi paralellik göstermektedir. *Pseudomonas* spp. suşlarının 2,4-D' yi karbon kaynağı olarak kullanıp degradasyonu esnasında ramnolipid üretimi ile ilgili herhangi bir literatür bilgisine rastlanılmamıştır.

Günümüzde tarımsal alanlarda görülen herbisit kirliliğinin yanı sıra otomobil kullanımının artmasına paralel olarak benzin ve dizel istasyonlarının sayısı da artmaktadır. Böyle istasyonlarda ki fuel oil, transfer ve servis işlemleri esnasında meydana gelen dökülmelerle tehlikeli atıklar olarak değerlendirilmektedir. Bu tesadüfi dökülmeler, topraktaki hidrokarbonları kullanabilen mikroorganizmaların sayısının artmasına neden olduğu, mikroorganizma sayısında ki bu çoğalma veya azalmanın belirli ekosistemlerde ki mikrobiyal kominitenin içerisinde mevcut olan



mikroorganizma türüne ve kirlilik yaratan hidrokarbonların kimyasal kompozisyonuna bağlı olduğu bildirilmiştir [152].

Rahman ve ark. (2002) bakterilerin benzin ve dizel istasyonlarındaki topraklarda bulunan çeşitli mikroorganizmaları izole etmişler, bu bakterilerin farklı zamanlarda ham petrolde ki bakteriyal gelişimlerini mikrobiyal sayım yöntemi ile, degridasyonu ise ham petrolün ilk ve son konsantrasyonları arasındaki farka göre spektrofotometrik olarak belirlemişler ve izole ettikleri türler arasında *Pseudomonas* spp.'lerinin dominant mikroorganizmalar olduğunu bildirmişlerdir [153].

Marchal ve ark. (2003) benzin ve dizel gibi fuel'lerin atık sularından izole ettikleri aerobik mikroflorayı kullanarak biyolojik degridasyonunu belirlemişlerdir. Benzin % 96 oranında degridat olurken, dizelin degridasyonunun % 60-73 arasında olduğunu tespit etmişlerdir [154]. Ridgway ve ark. (1990) yer altı sularından izole edilen 121 adet bakteri suşları arasında, *P. putida* (% 18,4), *P. alcaligenes* (% 1,6) ve *P. cepecia* (% 0,41)'nin karbon ve enerji kaynağı olarak benzini kullanabildiklerini belirtmişlerdir [155]. Cunha ve Leite (2000) farklı toprak mikroorganizmalarıyla benzinin degridasyonunu araştırmışlardır. 30 °C' de 150 rpm, % 1 benzinle inkübe edilen suşların canlı hücre sayısı nutrient agarda dökme plak yöntemiyle 0 ve 72. saatlerde belirlemişlerdir. Benzin ve içeriğinde bulunan BTX' in degridasyonunu en iyi *P. putida*, *P. cepecia* ve *P. alcaligenes* türleri tarafından gerçekleştiğini bildirmişlerdir [156]. Bu çalışmada, 37 °C' de 100 rpm, % 2 benzinle ve % 1 BTX' in degridasyonu spektrofotometrik olarak belirlenmiş ve en iyi bakteri gelişiminin benzinde *P. putida* B15 (96. saat) ve BTX' de *P. stutzeri* B11 (48. saat) suşları tarafından gerçekleştiği tespit edilmiştir.

Benzinin içerisinde de bulunan ve toksik, kanserojen ve tehlikeli bileşikler içeren aromatik hidrokarbonlar, kontamine olmuş toprak ve yeraltı sularında bulunmaktadır. Bu bileşikler, doğal çevrelerde bulunan hidrokarbon-degrade eden mikroorganizmalar tarafından değiştirilebilir [157]. Endüstriyel alanlarda yüksek miktarlarda üretilen ve fueloiller, plastikler, sentetik fiberler ve pestisitlerin üretimi için başlatıcı materyaller ve çözücüler olarak kullanılmakta olan benzen, toluen ve

ksilen gibi monoaromatik hidrokarbonlar biyodegradasyon çalışmalarında tercih edilen hidrokarbonlardır [156]. Monoaromatik hidrokarbonlardan, benzen, toluen ve ksilen (BTX) yaygın olarak petrol ürünlerinden serbest kaldığı düşünülen yer altı suyu kirleticileridir. BTX' in çok düşük konsantrasyonlarının bile kanserojenik olduğu bilinmektedir. Buna ilaveten bu bileşikler EPA (Environmental Pollution Agency) tarafından öncelikli çevresel kirleticiler olarak sınıflandırılmaktadır. BTX bileşiklerinin diğer petrol hidrokarbonlarına nazaran suda ki yüksek çözünürlükleri ile kirletici kaynaklardan metrelerce aşağılara inerek yer altı sularıyla taşınıyor olması sebebiyle kirli alanlardan bu öncü kirleticileri ortadan kaldırmak için doğal biyodegradasyon yöntemlerinin ilgi çektiği düşünülmektedir. Bazı çalışmalar BTX' in aerobik ve anaerobik biyodegradasyonunu araştırmak için yapılmaktadır. Bu çalışmaların bir kısmı BTX bileşenlerinin saf veya karışık kültürlerle aerobik degradasyonuna odaklanmıştır [158].

Çalışmada aerobik şartlar altında *Pseudomonas* suşlarının ortamdaki benzini belli zaman aralıklarında (24, 48 72 ve 96 saat) karbon kaynağı olarak kullanması spektrofotometrik (600 nm) olarak belirlenmiştir. Bu amaçla *Pseudomonas* spp. suşları arasından benzini karbon kaynağı olarak en iyi kullanıp gelişen suşların 96. saatte *P. putida* B15 ve *P. aeruginosa* B3 suşları olduğu görülmektedir (Çizelge 4.8). Bu nedenle mikroorganizmanın benzini karbon kaynağı olarak kullandığı ortamdaki iyi gelişimi esas alınarak, benzini en iyi degrede eden suşların bu iki suş olduğu ve bu iki suşun benzin kirliliğinin biyoremediasyonunda kullanılabileceği düşünülmektedir. Diğer yandan spektrofotometrik ölçümler sonucunda benzinin çalışmada kullanılan genellikle bütün suşlar tarafından diğer organik bileşiklere oranla (2,4-D, BTX ve benzene) daha yavaş ve daha az degrede olduğu söylenebilir.

Bu çalışmada benzinin yanı sıra, kirleticilik bakımından çevredeki önemi yüksek olan benzen ve benzen türevlerinden (benzen, toluen ve ksilen) oluşan BTX karışımı (1:1) kullanılarak saf *Pseudomonas* spp. kültürleriyle aerobik biyodegradasyonu araştırılmıştır. Arafa (2003) Suudi Arabistan' da hidrokarbonla kirli topraklardan izole ettiği karışık kültürlerin BTX degradasyonunu araştırmıştır. Karışık bakteri kültürünün BTX' i tamamen degrede ettiğini ve bu karışık kültürün aromatik

hidrokarbon (BTX) kirliliğinin biyoremediasyonuna önemli derecede katkıda bulunacağını bildirmiştir [159]. Çalışmada, benzende en iyi gelişimin 72. saatte *P. fluorescens* B5 suşu tarafından, BTX' de ise en iyi mikroorganizma gelişiminin 48. saatte *P. stutzeri* B11 suşu tarafından olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.7, Çizelge 4.8).

Yapılan çalışmada benzin, BTX ve benzen gibi petrol hidrokarbanlarını karbon kaynağı olarak kullanıp degrede eden *Pseudomonas* spp. suşlarının piyosiyanın üretimleri araştırılmış ve en yüksek piyosiyanın üretiminin benzinde 96. saatte *P. aeruginosa* B3 (0,8 µg/mL), benzende 48. saatte *P. aeruginosa* B3 (1,3 µg/mL), ve BTX' de 48. saatte *P. aeruginosa* B3 (1,2 µg/mL) suşları tarafından bakteriyal gelişimin durgun fazında gerçekleştiği tespit edilmiştir (Çizelge 4.9, Çizelge 4.10). Norman ve ark. (2002) ham petrolde gelişen *P. aeruginosa*' nın piyosiyanın üretimini araştırmışlardır. Piyosiyanın, *P. aeruginosa*' nın stres koşullarında durgun fazda ürettikleri bakterisidal özellikler içeren ikincil bir metabolit olduğunu ve piyosiyanın üretiminin ham petrolü degradasyon kapasitesine olan pozitif etkisini bildirmişlerdir [16].

Son yıllarda yapılan bir çok araştırma, bakteriyal ekzopolimerlerin ve biofilmlerin petrol hidrokarbonları ile kirliliği alanlarda ki çevresel önemine dikkat çekmektedir [149, 160-162]. Biyoemülsifiyerlerin ticari olarak potansiyel kullanımı, petrol ile kirlenmiş toprak ve suların biyoremediasyonunu içerir. Mikroorganizmalar (*Pseudomonas* spp., *Rhodococcus* spp., *Acinetobacter* spp. gibi) petrol hidrokarbonlarında geliştikleri zaman emülsifiyer üretirler. *Pseudomonas* spp.' ler tarafından üretilen EPS' lerin yüksek moleküler ağırlıklı emülsifiyer olarak ticari kullanımları bildirilmiştir [65]. Çalışmada suşların çevredeki stres koşullarında üretilen ve diğer önemli bir metabolit olan EPS üretimleri belirlenmiştir. Geesey ve ark. (1994) mikroorganizmaların ham petrolün toksik etkilerinden korunmak için EPS oluşturduklarını belirtmişlerdir [163]. Bazı araştırmacılar toksik maddelere ve kurumlara karşı bakterileri koruyan EPS üretimini topraktan izole ettikleri *Pseudomonas* spp.' lerinde çalışmışlar ve EPS üreten bu mikroorganizmaların toksik bileşiklere yüksek toleransı ve direncinin seçici avantajlar sağladığına dikkati

çekmişlerdir [164, 165]. Fusconi ve Godinho (2002) yer altı suları kirli subtropical bölgelerden izole ettikleri bakterilerin ekzopolisakkarit üretimini araştırmışlardır. Bu alanlardan izole ettikleri *Gordonia polyisoprenivorans* suşunun pigment ve EPS üretme kapasitesi bakımından çevresel remediasyonda kullanılabilceğini bildirmişlerdir [164].

Bu çalışmada minimal besi ortamında karbon kaynağı olarak Benzin, BTX ve benzen gibi petrol hidrokarbonlarını kullanan *Pseudomonas* spp. suşlarının belli zaman aralıklarında (24, 48, 72 ve 96. saat) EPS üretimleri araştırılmış ve farklı organik kirleticilerde en yüksek EPS üretimlerinin benzinde 96. saatte *P. aeruginosa* B3 (9 mg/L), BTX’ de 48. saatte *P. stutzeri* B11 (30 mg/L) ve benzende 72. saatte *P. fluorescens* B5 (33 mg/L) suşları tarafından, bakteriyel gelişimlerinin durgun fazında oluşturulduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.3-Şekil 4.5.). *Pseudomonas* spp. suşlarında yüksek EPS üretiminin bakteriyel gelişiminin durgun fazında gerçekleştiği araştırmacıların yapmış olduğu çalışmalarla da desteklenmektedir [9, 151].

Benzen ve BTX’ de yüksek EPS üretimi gösteren *P. fluorescens* B5 ve *P. stutzeri* B11 suşlarının bu bileşiklerin toksik etkilerinden korunmak için ve yüksek EPS üretme kapasiteleri bakımından çevresel remediasyonda kullanılabilceği düşünülmektedir. Çalışmadaki suşların petrol hidrokarbonlarında ki bakteri üremesi ve EPS üretimi arasında paralellik olduğu görülmüş ve *Pseudomonas* spp. suşlarının bakteriyel gelişimi ve EPS üretimi arasındaki ilişki Pearson’s korelasyonuna göre belirlenmiştir. *Pseudomonas* spp. suşlarının benzin de 24. saatte ( $\alpha= 0,01$  anlamlılık düzeyinde) ve 48. saatte ( $\alpha= 0,05$  anlamlılık düzeyinde), BTX ( $\alpha= 0,01$  anlamlılık düzeyinde) ve Benzende 24, 48, 72 ( $\alpha= 0,01$  anlamlılık düzeyinde) ve 96. saatlerde ( $\alpha= 0,05$  anlamlılık düzeyinde) bakteriyel gelişim ve EPS üretimi arasında pozitif bir korelasyon olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.13). Bazı araştırmacılar EPS üretimi ile bakteriyel gelişim arasında doğrudan bir korelasyon bulunduğunu belirtmektedir [151, 166]. Bu çalışmada da benzer sonuçlar elde edilmiştir.

*Pseudomonas* bakterileri heteropolisakkarit yapıda ve genellikle glikoz, galaktoz, riboz, mannoz ve N-asetil glikoz amin içeren EPS üretirler [162, 167]. Araştırmada

benzen, BTX ve benzin gibi petrol hidrokarbonlarında yüksek gelişim gösteren ve yüksek EPS üreten suşların (sırasıyla *P. fluorescens* B5, *P. stutzeri* B11 ve *P. putida* B15), nutrient broth (NB) ve Petrol hidrokarbonu+MSM besiortamlarında ürettikleri EPS' nin monomer yapısı HPLC analizi ile yapılmıştır. Çalışmada suşların ürettikleri EPS' nin başlıca bileşenlerinin glikoz, arabinoz, gliserol, riboz, galaktronik asit, N-asetil-D-Galaktoz Amin ve N-asetil-D-Glikoz Amin olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.16).

Besiyerinin kompozisyonu (karbon ve nitrojen kaynakları) ve inkübasyon şartları (sıcaklık, pH, zaman) gibi bir çok faktör, *Pseudomonas* cinsi bakterilerindeki EPS üretimi, özellikleri ve EPS' nin monomer yapısını değiştirdiği ile ilgili bir çok çalışma rapor edilmiştir (65, 151, 162, 167, 168]. Royan ve ark. (1999) endüstriyel atıklardan izole ettikleri *Pseudomonas mendocina* P<sub>2d</sub> suşunun karbon kaynağı olarak sodyum benzoatı kullanarak EPS üretimini incelemişlerdir. Bu suşun sodyum benzoatın toksik etkilerine karşı EPS ürettiklerini (919 mg/L) ve yüksek derecede emülsifiye aktivitesi olduğunu belirtmişlerdir. Bununla birlikte bu suşun ürettiği EPS' nin monomer yapısını gaz kromatografisi (GC) kullanarak belirlemişlerdir. Buna göre EPS' nin şeker kompozisyonunda hekzozlar (ramnoz % 50,79, füköz % 3,33 ve glikoz % 7,23) ve pentozların (riboz % 6,53, arabinoz % 0,76 ve mannoz % 19,21) bulunduğunu bildirmişlerdir [167]. Hino ve ark. (1997), atık topraklardan petrol hidrokarbonlarını (ham petrol, toluen, propil benzen, salisilat, n-dodekan, etanol, butanol ve asetat) karbon kaynağı olarak kullanan *Pseudomonas putida* SL1 suşunu izole etmişler ve HPLC' de petrol hidrokarbonlarında ürettiği EPS' nin monomer kompozisyonu araştırmışlardır. Bu suşun ürettiği EPS' nin monomer yapısındaki şekerlerin içeriğinin glikoz (9.9), galaktoz (1.0), mannoz (3.0), ribuloz (4.6), N-asetilglikozamin (1.6), ksiloz (1.5) ve N-asetilgalaktozamin (2.1) olduğunu belirtmişlerdir [162]. Bu çalışmada da, bakterilerin üretildiği besiortamının farklılığına göre EPS' deki içerik ve oranların değişiklik gösterdiği belirlenmiştir.

Biyosürefektan üreten bakteriler hidrokarbonla kirlenmiş bölgelerde yüksek konsantrasyonlarda bulunmaktadır. Bu bakteriler biyoremediasyon için potansiyel uygulamalar ve yüzey-aktif özellikleriyle yeni bileşiklerin faydalı bir kaynağını sunar

[169]. Aromatik ve alifatik hidrokarbonlar olan hegzadekan, oktadekan, parafin penatren, tetradekan, pristan ve kreostat gibi hidrokarbonlarla kirletilmiş topraklarda ramnolipid biyosülfektanların ilavesinin biyolojik parçalanmayı arttırması ile ilgili bir çok çalışma bulunmaktadır [64, 66]. Ramnolipid biyosülfektanı üreten *Pseudomonas* türleri ile yapılan çalışmalarda ramnolipidlerin oluşumunda karbon kaynaklarının önemli olduğu vurgulanmaktadır [170]. Ham petrol ve diğer hidrokarbonların mikroorganizmalar tarafından degradasyonun da çeşitli sülfektanlar arasında ramnolipidlerin de bir çok hidrokarbonun degradasyonunu arttıracığı bildirilmiştir [171]. Zhang ve ark. (2005) *P. aeruginosa* tarafından ramnolipidlerin varlığında ham petrolün biyodegradasyonunu araştırmışlar ve etkili bir biyosülfektan olan ramnolipidin hidrokarbonların biyodegradasyonunu arttırdığını bildirmişlerdir [172].

*Pseudomonas* spp. suşlarının biyosülfektan (ramnolipid) üretimi üzerine yapılan çalışmalar, ramnolipid sentezinin ikincil metabolizma ile ilişkili olduğunu ve ikincil metabolitlerin sentezinin üremenin durgunluk fazına erişmesi ile arttığını göstermektedir. Ramnolipid eldesi için uygun inkübasyon süresinin 72 saat olduğunu bildiren çalışmaların yanı sıra yüksek ramnolipid sentezine üretimin 24, 90 ve 120 saatlerde rastlandığını bildiren araştırmalar da vardır [173-176].

Farklı karbon kaynaklarının ramnolipid sentezi üzerine etkili olduğunu bildiren çalışmalar mevcuttur [175,177].

Yapılan çalışmada bazı petrol hidrokarbonlarını (benzin, BTX ve benzen) kullanabilen *Pseudomonas* spp. suşlarının belli zaman aralıklarındaki (24, 48, 72 ve 96. saat) degradasyonu esnasında en yüksek ramnolipid biyosülfektan üretimi benzinde *P. putida* B15 (52 mg/L), benzende *P. fluorescens* B5 (1,5 mg/L), BTX' de *P. aeruginosa* B3 (0,5 mg/L), suşları tarafından 72. saatte, bakteriyal gelişimin durgun fazında olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.4). Tuleva ve ark. (2002) da, *P. putida* 21BN suşunun hegzadekanda geliştiğinde biyosülfektan üretimini araştırmışlardır. Bu suşun, ikincil bir metabolit olan biyosülfektanları durgun fazda maksimum üretime ulaştığını (1,2 g/L) bildirmişlerdir [178]. Raza ve ark. (2006)

farklı hidrokarbonlar kullanarak *P. aeruginosa* EBN-8 mutantının biyosümfektan üretimini araştırmışlardır. Bu amaçla minimum besiyeri içine karbon kaynağı olarak n-hekzan, parfin yağı ve kerosen yağı ilave etmişlerdir. 37 °C’ de 100 rpm’ de 10 gün boyunca 24 saatte bir örnekler almışlardır. Bu mutantın n-hekzadekan ve parafin yağında geliştiğı zaman inkübasyonun 3. ve 4. gününden sonra maksimum ramnolipid ürettiğini, n-hekzadekan ve parafin yağında ramnolipid üretiminin ise sırasıyla 4,1 ve 6,3 g/L olduğunu tespit etmişlerdir [180]. Bu sonuçlarda, bu çalışmanın sonuçlarını desteklemektedir.

Sonuç olarak endüstriyel ve tarım alanlarında kullanılan, su ve karasal ekosistemlerde risk oluşturan organik kirleticilerin mikroorganizmalar yoluyla biyodegradasyon ve biyoremediasyon çalışmaları son yıllarda önem kazanmış bir işlemdir. Bu alanda kullanılan mikroorganizmalar özellikle *Pseudomonas* spp.’ lerinin yardımı ile hem çevrede sorun oluşturan kirletici ajanlar ortadan kaldırılarak çevre kirliliğı azaltılması hemde biyoteknolojik açıdan önemli olan ve çok değişik endüstrilerde insanlara hizmet eden metabolitlerin eldesinin biyoteknoloji alanındaki araştırmalara yeni bir boyut getireceğı düşünölmektedir.

Çalışmada çevrede kirlilik yaratan ve canlılar üzerine toksik etkileri bakımından risk teşkil eden bazı kirletici faktörlerin, toprakta yaygın olarak bulunan *Pseudomonas* cinsi bakteriler tarafından ortadan kaldırılmasına yönelik biyodegradasyon çalışmaları gerçekleştirilmiş ve bu esnada, çok değişik endüstrilerde önemli hammaddelerden olan piyosiyenin, ekzopolisakkarit ve ramnolipid biyosümfektanının bakteriyal kaynaklardan eldesi araştırılmıştır. Bu amaçla araştırmada farklı organik kirleticilere göre *Pseudomonas* spp.suşlarının bakteriyal gelişimlerinde ve ikincil metabolit üretimlerinde farklılıklar olduğu ve bu organik kirleticiler arasında suşların en iyi 2,4-D herbisitinde gelişim gösterdiği bu bakteri gelişimine bağılı olarak, yüksek ikincil metabolit üretiminin de 2,4-D herbisitinde *P. aeruginosa* B1 suşu tarafından gerçekleştirildiğı bulunmuştur. Dolayısıyla *P. aeruginosa* B1 suşunun 2,4-D herbisitiyle kirli alanların çevresel remediasyonunda bununla birlikte bu bileşiğı degradasyonları esnasında yüksek oranda ürettikleri bazı ikincil metabolitlerin (piyosiyenin, EPS ve ramnolipid) çeşitli endüstrilerde (antibiyotik eldesi, biyokontrol

ajarı, biyoemülsülfier ve biyoremediasyon çalışlarında) endüstriyel kullanım için potansiyel olabileceği düşünölmektedir. Bu suşun kirli ortamlarda invivo uygulamalarda kullanımına bağlı olarak degradasyon ve metabolit üretim verimini artırmaya yönelik moleküler çalışmaları bundan sonraki aşamalarda göz önüne alınacaktır. Yaptığımız biyodegradasyon çalışmasının yanı sıra endüstriyel öneme sahip ikincil metabolit üretim çalışmaları ile elde ettiğimiz sonuçların ilk olması sebebiyle konu ile ilgili bundan sonraki çalışmalara ışık tutacağı inancındayız.



### KAYNAKLAR

1. Tefloncu A., "Biyoteknoloji", *Ege Üniversitesi Yayınlar*,. Bornova, İzmir, (1995).
2. Meyer, J. M., "Pigment fluorescent et Métabolisme du fer chez *Pseudomonas fluorescens*", *Thèse d'Etat*, Strasbourg, 328 (1977).
3. Sutherland, I.W., "Polysaccharases for microbial exopolysaccharides", *Carbohydrate Polymers*, 38, 319-328 (1999).
4. Cerantola, S., Bounery, J. D., Segonds, C., Marty, N. and Montrozier, H., "Exopolysaccharide production by mucoid and non-mucoid strains of *Burkholderia cepecia*", *FEMS Microbiol. Lett.*, 185: 243-246 (2000).
5. Cox, C. D., "Role of pyocyanin in the acquisition of iron from transferrin", *Infect. Immun.* 52: 263-270 (1986).
6. Desai, J. D. and Banat, I. M., "Microbial production of surfactants and their commercial potential", *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 61: 47-64 (1997).
7. Essar, D. W., Eberly, L., Hadero, A., and Crawford, I. P., "Identification and characterization of genes for a second anthranilate synthase in *Pseudomonas aeruginosa*: Interchangeability of the two anthranilate synthases and evolutionary implications", *J. Bacteriology*, 172: 884-900 (1990).
8. Nereus, W., Gunther I. V., Nunez, A. Fett, W., and Solaiman, K. Y., "Production of rhamnolipids by *Pseudomonas chlororaphis*, a nonpathogenic bacterium", *Appl. Environ. Microbiol.*, 71: 2288-2293 (2005).
9. Steinberger, R. E. and Holden P. A., "Macromolecular composition of unsaturated *Pseudomonas aeruginosa* biofilms with time and carbon source", *Biofilms*, 1: 37-47 (2004).
10. Sneath, P. H. A., "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology", Edited by P. H. A. Sneath, N. S., Mair, M. E., Sharpe, J. G. Holt, *Williams and Wilkins*, 1 Baltimore, 2: 141-199 (1986).
11. Collier, L., Balow, A., Sussman, M., "Topley & Wilson's Microbiology and Microbiol Infections", *Systematic Bacteriology*, 9<sup>th</sup> edition, 2: 1091-1118 (1998).
12. Jamir, Y., Guo, M., Oh, H.-S., Petnicki-Ocwieja, T., Chen, S. , Tang, X., Dickman, M. B, Collmer, A. and Alfano, J. R., "Identification of *Pseudomonas syringae* type III effectors that can suppress programmed cell death in plants and yeast". *Plant J.* , 37:554-565 (2004).

13. Murray, P. R., Baron, E. J., Pfaller, M. A., Tenover, F. C., Tenover, R. H., “Manual of Clinical Microbiology, 6<sup>th</sup> Edition”, *ASM Pres.*, Woods, G. L. and Washington, D. C, 1327-1341 (1995).
14. Tortora, G. J., “Microbiology: An introduction”, *The Benjamin Cumings Publishings Company*, California, 217-276 (1991).
15. Asthana, S., Rusin, P., and Gerba, C. P., “Influence of hydrocarbons on the virulence and antibiotic sensitivity associated with *Pseudomonas aeruginosa*”, *Int. J. Environ. Health Research*, 7: 277-287 (1997).
16. Norman, R. S., Moeller, P., McDonald, T. J. and Morris, P. J., “Effect of pyocyanin on a crude-oil-degrading microbial community”, *Appl. Environ. Microbiol.*, 70: 4004-4011 (2004).
17. Demain, A. L., "Pharmaceutically active secondary metabolites of microorganisms", *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 52: 455-463 (1999).
18. Mandelbaum, R. T., Allan, D. L., and Wackett, L. P., “Isolation and Characterization of a *Pseudomonas* sp. That Mineralizes the *s*-Triazine Herbicide Atrazine”, *Appl. Environ. Microbiol.*, 61:1451–1457 (1995).
19. Essar, D. W., Eberly, L., Hadero, A., and Crawford, I. P., “Identification and characterization of genes for a second anthranilate synthase in *Pseudomonas aeruginosa*: Interchangeability of the two anthranilate synthases and evolutionary implications”, *J. Bacteriology*, 172: 884-900 (1990).
20. Budzikiewicz, H. ‘Secondary metabolites from fluorescent pseudomonads’, *FEMS Microbiol. Rev.*, 104: 209-228 (1993).
21. Töreci, G. Ü., “*Pseudomonas aeruginosa*’nın pigmentleri toksinleri ve enzimleri”, *II. Ulusal Kükem Kongresi*, s., 76-91 (1981).
22. Leisinger, T., and Margraff, R., “Secondary Metabolites of The Fluorescent Pseudomonads”, *Microbiol. Rev.*, 43: 422-442 (1979).
23. Ingram, J. M., and Blackwood, A. C., “Microbial production of phenazines”, *Adv. Appl. Microbiol.* 13: 267-282 (1970).
24. Wilson, S. G. and Miles, A. A. “Principles of Bacteriology and Immunity”, *Edward Arnold (Publishers) Ltd.* London, 636-643 (1964).
25. King, E. O., Ward, W. K. and Raney, D. E., “Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein”, *J. Lab. Clin. Med.* 44: 301-307 (1954).

26. Turner, J. M., and Messenger, A. J., "Occurrence, biochemistry, and physiology of phenazine pigment production", *Adv. Microbiol. Physiol.* 27: 211-275 (1986).
27. Gram, L., Mulchtorsen, J., Spanggaard, B., Huber, I. and Nielsen, T., F., "Inhibition of *Vibrio anguillarum* by *Pseudomonas fluorescens* AH2, a possible probiotic treatment of fish", *Appl. Environ. Microbiol.*, 65: 969-973 (1999).
28. Neilands, J. B., "Microbial iron compounds", *Annu. Rev. Biochem.*, 50: 715-731 (1981).
29. Buyer, J. S. and Leong, J., "Iron transport-mediated antagonism between plant growth-promoting and plant-deleterious *Pseudomonas* strains", *J. Biol. Chem.*, 261: 791-794 (1986).
30. Hemming, B. C., Orser, C., Jacobs, D. L., Sands, D. C. and Strobel, G. A., "The effects of iron on microbial antagonism by fluorescent *Pseudomonads*", *J. Plant. Nutr.*, 5: 683-702 (1982).
31. Bar-ness, E., Chen, Y., Hadar, Y., Marschener, H. and Romheld, V., "Siderophores of *Pseudomonas putida* as an iron source for dicot and monocot plants", *Plant Soil*, 130: 231-241 (1991).
32. Crowley, D. E., Reid, C. P. and Szanzlo, P. J., "Microbial siderophores as iron sources for plants", In G. Winkelmann, D. van der Helm, and J. B. Neilands (ed.), Iron transport in microbes, plants and animals, *VCH Verlagsgesellschaft*, Weinheim, Germany, 375-386 (1987).
33. Hordt, W., Romheld, V. and Winkelmann, G., "Fusarinins and dimerum acid, mono- and dihydroxamate siderophores from *Penicillium chrysogenum*, improve iron utilization by strategy I and strategy II plants", *Biometals*, 13: 37-46 (2000).
34. Budzikiewicz, H., "Siderophores of fluorescent *Pseudomonas*", *Zeitschrift für Naturforschung*, 52c, 713-720 (1997).
35. Meyer, J. M., and Abdallah, M. A., "The fluorescent pigment of *Pseudomonas fluorescens*: Biosynthesis, purification and physicochemical properties", *J. Gen. Microbiol.*, 107: 319-328 (1978).
36. Meyer, J. M., and Hornsperger, J. M., "Role of pyoverdine, the iron-binding fluorescent pigment of *Pseudomonas fluorescens*, in iron transport", *J. Gen. Microbiol.*, 107: 329-331 (1978).
37. Sutherland I. W., "Novel and Established Applications of Microbial Polysaccharides", *Trends Biotechnol.*, 16: 41-46 (1998).

38. Calazans G. M. T., Lopes C. E., Lima R. M. O. C., de Franc FP., "Antitumor Activities of Levans Produced by *Zymomonas mobilis* Strains", ***Biotechnol. Lett.***, 19-21 (1997).
39. Lee I.Y., Seo W. T., Kim G. J., Kim M. K., Ahn S. G., Kwon G. S., Park Y. H., "Optimization of Fermentation Conditions for Production of Exopolysaccharide by *Bacillus polymyxa*", ***Bioprocess. and Biosystems Engineering***, 16 (2): 71-75 (1997).
40. Gugliandola C., Maugeri TL., Cacamo D., Stackebrandt E., "*Bacillus aeolius* sp. Nov a Novel Thermophilic, Holophilic Marine *Bacillus* Species from Eolian Islands(Italy)", ***Syst. Appl. Microbiol.***, 26 (2):172-176 (2003).
41. Kenne L., and Lindberg B., in Aspinall G.O., ed., "The Polysaccharides", ***Academic Press***, New York, 2: 287-363 (1983).
42. Sutherland I.W., "Biotechnology of Microbial Exopolysaccharides", ***Cambridge University Press***, Cambridge 125-131 (1990).
43. Kazy, S, K., Sar, P., Asthana, R, K. and Singh, S, P., "Copper Uptake and Its Compartmentalization in *Pseudomonas aeruginosa* Strains: Chemical Nature of Cellular Metal", ***World J. Microbiol. Biotechnol.***, 15: 599-605 (1999).
44. Cerning, J., "Exocellular polysaccharides produced by lactic acid bacteria". ***FEMS Microbiol. Reviews***, 87: 113-130 (1990).
45. Sutherland I. W., "Microbial Exopolysaccharide synthesis", In Extracellular Microbiya Polysaccharide (eds Sanford, P. A. and Laskin, A.) ***Am. Chem. Soc.***, Washington, 40-57 (1977).
46. Shankar S, Ye RW., Schlichtman D., and Chakrabarty AM., "Exopolysaccharide Alginate Synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*: Enzymology and Regulation of Gene Expression", ***Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.***, 70: 221-255 (1995).
47. Bouzar, Cerning, J., Desmazeaud, M., "Exopolysaccharide production in milk by *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* CNRZ 1187 and by two colonial variants", ***J. Dairy Sci.***,79: 205-211 (1996).
48. Hosono, A., Lee, J., Amentoni, A., Natsume, M., Hirayama, M., Adachi, T., Kaminogawa, S., "Characterization of a water-soluble polysaccharides fraction with immunopotentiating activity from *Bifidobacterium adolescentis* M 101-4.", ***Biosci. Biochem.***, 61: 312-316 (1997).
49. Leigh, J.A., Walker, G.C., "Exopolysaccharides of Rhizobium: Synthesis, regulation and symbiotic function", ***Trends in Genetics***, 10: 63-67 (1994).

50. Whitfield, C., Amor, P.A., Koplín, R., "Modulation of the surface architecture of gram-negative bacteria by the action of surface polymer: lipid A-core ligase and by determinants of polymer chain length", *Mol. Microbiol.*, 23: 629-638 (1997).
51. Yurlova, N, A. and de Hoog, G, S., "A New Variety of *Aureobasidium pullulans* Characterized by Exopolysaccharide Structure, Nutritional Physiology and Molecular Features", *Antonie van Leeuwenhoek* 72: 141-147 (1997).
52. Sanford, P. A., and Baird, J., "Industrial utilisation of polysaccharides", In The Polysaccharides, Vol.2.cd. Aspinall, G. O., New York: *Academic Press*, pp. 412-485 (1983).
53. Yalpani M., and Sanford P. A., "Commercial Polysaccharides: Recent Trends and Developments", In: Yalpani M., editor, Industrial Polysaccharides Genetic Engineering, Structure/Property Relations and Applications. Amsterdam, *Elsevier Science Publishers* p. 311-35, (1987).
54. Becker A., Katzen A., Pühler and L., Ielpie "Xanthan Gum Biosynthesis and Application: a Biochemical/Genetic Perspective", *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 50: 145-152 (1998).
55. Manresa, A., Espuny, M, J., Guinea, J., and Comelles, F., "Characterization and Production of A New Extracellular Polymer from *Pseudomonas* sp. GSP-910", *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 26: 347-351 (1987).
56. Kene, L. and Lindberg, B., "Bacterial polysaccharide", In the Polysaccharides, ed. Aspinall, G.O., New York: *Academic Press*, 2: 287-363 (1982).
57. Kitazawa H., T. Toba T., Itoh N., Kumano S., Adachi and T., Yamaguchi, "Antitumoral Activity of Slime-Forming, Encapsulated *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* Isolated from Scandinavian Ropy Sour Milk, "viili", *Animal Sci. Technol.*, 62: 277-283 (1991).
58. Margaritis A., Pace G. W., "Microbial Polysaccharides". In: Blanch H. W., Drew S., Wang D. I. C., editors, Comprehensive Biotechnology, vol. 3. The Practice of Biotechnology: Current Commodity Products. *Oxford: Pergamon Pres*, 1005-44 (1985).
59. Nakajima H., Y. Suzuki, H. Kaizu, and T. Hirota, "Cholesterol Lowering Activity Of Ropy Fermented Milk", *J. Food. Sci.*, 57:1327-1329 (1992a).
60. Cameotra, S. S. and Makkar, R. S., "Synthesis of biosurfactants in extreme conditions", *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 50: 520-529 (1998).

61. Para, J. L., Guinea, J., Manresa, M. A., Robert, M., Mercadé, M. E., Commelles, F., Bosch, M. P., "Chemical Characterization and Physicochemical Behaviour of biosurfactants", *J. Am. Chem. Soc.*, 66: 141-145 (1989).
62. Desai, J. D., Banat, I. M., "Microbial Production of Surfactants and Their Commercial Potential", *Microbiol. Molecul. Biol. Rev.*, 47-64 (1997).
63. Lang S., Wullbrandt, D. "Rhamnose lipids-Biosynthesis Microbial Production and Application Potential", *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 51: 22-32 (1999).
64. Zhang Y. and Miller R. M., "Effect of Rhamnolipid (Biosurfactant) Structure on Solubilization and Biodegradation of n-Alkanes", *Appl. Environ. Microbiol.*, 61: 2247-2251 (1995).
65. Bonilla, M., Olivaro, C., Corona, M., Vazquez, A., and Soubes, M. "Production and Characterization of A New Bioemulsifier From *Pseudomonas putida* ML2", *J. Appl. Microbiol.*, 98: 456-463 (2005).
66. Herman D. C., Zhang Y., Miller R. M., "Rhamnolipid (Biosurfactant) Effects on Cell Aggregation and Biodegradation of Residual Hexadecane Under Saturated Flow Conditions", *Appl. Environ. Microbiol.*, 63: 3622-3627 (1997).
67. Winson, M. K., Camara, M., Latifi, A., Foglino, M., Chhabra, S. R., Daykin, M., Bally, M., Chapon, V., Salmond, G. P. C., Bycroft, B. W., Lazdunski, A., Stewart, G. S. A. B., and Williams, P., "Multiple N-acyl-L-homoserine lactone signal molecules regulate production of virulence determinants and secondary metabolites in *Pseudomonas aeruginosa*", *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92: 9427-9431 (1995).
68. Madigan M.T., Martinko J.M., Parker J., Brock "Biology of Organisms", Tenth Edition, 2003, Chapter 12 (416-444) & Chapter 30 (966-972).
69. Fakhouri, W., Walker, F., Vogler, B., Armbruster, W. and Buchenauer, H., "Isolation and identification of N-mercapto-4-formylcarbostyryl, an antibiotic produced by *Pseudomonas fluorescens*", *Phytochemistry*, 58: 1297-1303 (2001).
70. Giri, A. V., Anandkumar, N. Muthukumarani, G., and Pennathur, G. "A novel medium for the enhanced cell growth and production of prodigiosin from *Serratia marcescens* isolated from soil", *BMC Microbiol.*, 4: 11 (2004).
71. Demain, A. L. 'Induction of secondary metabolism', *Internatl. Microbiol.*, 1: 259-264 (1998).
72. Schlegel, H. 'Produktion Sekundärer Metabolite', *Allgemeine Mikrobiologie, Georg-Thieme Verlags*. 362-371 (1992).

73. Weinberg, E. D. 'Secondary Metabolism:raison d'etre. Perspect', *Biol. Med.*, 14: 565-577 (1971).
74. Calvo, C., Martínez-Checa, F., Toledo, F., Porcel, J., Quesada E. "Characteristics of bioemulsifiers synthesised in crude oil media by *Halomonas eurihalina* and their effectiveness in the isolation of bacteria able to grow in the presence of hydrocarbons", *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 60: 347-351 (2002).
75. Raza, Z. A., Khan, M. S., Khalid, Z. M., and Rehman, A., "Production of Biosurfactant Using Different Hydrocarbons by *Pseudomonas aeruginosa* EBN-8 Mutant", *Z. Naturforsch.*, 61c: 87-94 (2006).
76. Jarvis, F. G. and Johnson, M. J., "A glyco-lipide produced by *Pseudomonas aeruginosa*", *J. Am. Chem. Soc.*, 71: 4124-4126 (1949).
77. Herman D. C., Zhang Y., Miller R. M., "Rhamnolipid (Biosurfactant) Effects on Cell Aggregation and Biodegradation of Residual Hexadecane Under Saturated Flow Conditions", *Appl. Environ. Microbiol.*, 63: 3622-3627 (1997).
78. Roberts, E. R., "Remediation of Petroleum Contaminated Soils", *Lewis Publishers*, New York Washington, D.C. 139, 249 (1992).
79. Riser-Roberts, E. "Bioremediation of Petroleum Contaminated Sites". CK Smoley, *CRC Press*, Boca Raton, FL, 197 (1992).
80. Stoner, D. L., "Biotechnology for the treatment of hazardous waste", Florida, *CRC Pres.* 202 (1993).
81. Bertrand, J. C., Coumette, G., Mille, G., Denis, M., "Anaerobic biodegradation of hydrocarbons", *Sci. Prog. Oxf.*, 73: 333-350 (1989).
82. Eweis, J. B., Ergas, S. J., Chang, D., Schroeder, E. D., "Bioremediation principles", *WCB*, McGraw-Hill, Boston, 305 (1998).
83. Whyte, L. G. , Bourbonniere, L., and Greer C. W., "Biodegradation of Petroleum Hydrocarbons by Psychrotrophic *Pseudomonas* Strains Possessing Both Alkane (*alk*) and Naphthalene (*nah*) Catabolic Pathways", *Appl. Environ. Microbiol.*, 3719-3723 (1997).
84. Smith, M. R., "The biodegradation of aromatic hydrocarbons by bacteria", *Biodegradation*, 1: 191-206 (1990).
85. Oh, Y. S., Shareefdeen, Z., Baltiz, B. C. and Bartha, R., "Interactions between Benzene, Toluene, and p-Xylene (BTEX) during their biodegradations", *Biotechnol. Bioeng.*, 44: 533-538 (1994).

86. Deep, R. A., Alvarez- Cohen, L., “Temperature Effect and substrate interactions during the aerobic biotransformation of BTEX mixtures by toluene-enriched consortia and *Rhodococcus rhodochrous*”, **Biotechnol. Bioeng.**, 62: 526-536 (1999).
87. Hamed, T. A., Bayraktar, E., Mehmetoğlu, T., Mehmetoğlu, Ü., “Substrate interactions during the biodegradation of benzene, toluene and phenol mixtures”, **Process Biochem.**, 39: 27-35 (2003).
88. Inoue, A., Yamamoto, M. and Horikoshi, K., “*Pseudomonas putida* which can grow in the presence of toluene”, **Appl. Environ. Microbiol.**, 57: 1560-1562 (1991).
89. Okay, S. O., Morkoç, E. ve Tüfekçi, V., “Fitoplanktonların üreme kinetiklerinin besin elementlerinin, atık suların ve zehirli maddelerin etkisi altında kesikli ve sürekli sistemlerde incelenmesi, Proje No: 15.1.001 **Çevre Müh. Bölümü Tubitak-Mam.**, Gebze-Kocaeli, 165 (1994).
90. Öztürk, S., “Tarım ilaçları”, **Hasad Ofset**, İstanbul, 523 (1990).
91. Öngen, N. K., “Herbisit-Toprak ilişkileri”, **Zirai Mücadele Araştırma Enstitüsü**, Bornova-İZMİR, 29s. (1990).
92. “Chemical structure of 2,4-D”, [ipmworld.umn.edu/chapters/wareherb/2,4-D.gif](http://ipmworld.umn.edu/chapters/wareherb/2,4-D.gif) (2006).
93. Ghosal, D., You, I. S., Chatterjee, D. K. and Chakrabarty, A. M., “Microbial degradation of halogenated compounds”, **Science**, 288: 135-142 (1985).
94. Ecobichon, D. J., “Toxic effects of pesticides (In: Casserett and Doull’s toxicology”, **The Basic Science of Poisons**, Fourth Ed, **Pergamon Pres**, 599-602 (1992).
95. Chakrabarty, A. M., “Biodegradation and identification of environmental pollutants”, **CRC Pres Inc.** Florida USA, 20-28 (1982).
96. Don, R. H., and Pemberton, J. M., “Properties of six pesticide degradation of plasmids isolated from *Alcaligenes paradoxus* and *Alcaligenes eutrophus*”, **J. Bacteriol.**, 145: 681-686 (1981).
97. Sinton, G. L., Fan, L. T., Erickson, L. E., and Lee, S. M., “Biodegradation of 2,4-D and related xenobiotic compounds”, **Enzyme. Microbiol. Technol.**, 8: 395-403 (1986).
98. Fisher, P. R., Appleton, J., and Pemberton, J. M., “Isolation and characterization of the pesticide-degrading plasmid pJPI from *Alcaligenes paradoxus*”, **J. Bacteriol.**, 135: 798-804 (1978).



99. Kilpi, S., Backstorm, V. and Korhola, M., "Degradation of 2-methyl-4-chlorophenoxyacetic acid (MCPA), 2,4-Dichlorophenoxy acetic acid (2,4-D), benzoic acid and saccharic acid by *Pseudomonas* sp. HV3", *FEMS Microbiol Lett.* 8: 177-182 (1980).
100. Don, R. H. and Pemberton, J. M., "Properties of six pesticide degradation plasmids isolated from *Alcaligenes paradoxus* and *Alcaligenes eutrophus*", *J. Bacteriol.*, 145: 681-686 (1981).
101. Pemberton, J. M. and Fisher, P. R., "2,4-D plasmids and persistence", *Nature*, 268: 732 (1977).
102. Pieper, D. H., Reineke, W., Emgesser, K. H., and Knackmuss, H. J., "Metabolism of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid, 4-chloro-2-methylphenoxyacetic acid and 2-methylphenoxyacetic acid by *Alcaligenes eutrophus* JMP 134", *Arch. Microbiol.*, 150: 95-102 (1988).
103. Don, R. H., Wightman, A. J., Knackmuss, H. J., and Timmis K. N., "Transposon mutagenesis and cloning analysis of the pathways for degradation of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and 3-chlorobenzoate in *Alcaligenes eutrophus* JMP 134 (pJP4)", *J. Bacteriol.*, 161: 85-90 (1985).
104. Streber, W. R., Timmis, K. N., and Zenk, M. H., "Analysis, cloning and high level expression of 2,4-dichlorophenoxyacetate monooxygenase gene *tfdA* of *Alcaligenes eutrophus* JMP 134", *J. Bacteriol.*, 169: 2950-2955 (1987).
105. Hamilton et al., 1989 Hamilton, P. b., Lean, D. R. S., Jackson, G. S., Kaushik, N. K., Solomon, K. R., "Effect of two applications of atrazine on the water quality of freshwater enclosures", *Environ. Pollut.*, 60: 291-304 (1989).
106. Weed Control Handbook, *Blackwell Scientific Publications*, Oxford and Edinburgh, 2: 180-211, 257 (1968).
107. Sandman, E. R. I. C., Loos, M. A., and van Dyk, L. P., "The microbial degradation of 2,4-D in soil", *Rev. Env. Cont. and Toxicol.*, 101:1-53 (1988).
108. Loos, M. A., Roberts, R. N., Alexander, N. R., Koiv, V. M., Heinaru, A. L., "Characterization of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid degrading plasmid pEST4011: Physical map and localization of catabolic genes", *J. Gen. Microbiol.*, 139: 3165-3170 (1993).
109. Bhat, M. A., Tsuda, M., Horiike, K., Nozaki, M., Vaidyanathan, C. S., and Nakazawa, T., "Identification and characterization of a new plasmid carrying genes for degradation of 2,4-dichlorophenoxyacetate from *Pseudomonas cepacia* CSV 90", *Appl. Environ. Microbiol.*, 60: 307-312 (1994).

110. Atlas, R. M. and Parks, L.C., "Handbook of Microbiological Media Second edition", **CRC Press**, New York, 1444 (1997).
111. Cruikshank, R., "Medical microbiology 11<sup>th</sup> ed.", **Livingstone**, London, 356 (1972).
112. Rajmohan,S., Dodd, C. E. R. and Waites, W. M., "Enzymes from isolates of *Pseudomonas fluorescens* involved in food spoilage", **J. Appl. Microbiol.**, 93: 205-213 (2002).
113. Bilgehan, H., "Klinik Mikrobiyolojik Tanı", Fakülteler Kitabevi, **Barış Yayınları**, İzmir, 134-135 (1995).
114. Kurachi, M. "Studies on The Biosynthesis of Pyocyanine II. Isolation and determination of pyocyanine", **Bull. Inst. Chem. Res.**, Kyoto Univ., 36: 174-187 (1958).
115. Cérantola, S., Bounéry, J, D., Segonds, C., Marty, N., and Montrozier, H., "Exopolysaccharide Production by Mucoïd and Non-mucoïd Strains of *Burkholderia cepacia*", **FEMS Microbiol. Lett.**, 185: 243-246 (2000).
116. Torino, M, I., Taranto, M, P., Sesma, F., and de Valdez, G, F., "Heterofermentative Pattern and Exopolysaccharide Production by *Lactobacillus helveticus* ATCC 15807 in Response to Environmental pH", **J. Appl. Microbiol.**, 91: 846-852 (2001).
117. Dubois, M., Gilles, K, A., Hamilton, J, K., Rebers, P, A., and Smith, F., "Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances", **Anal. Chem.**, 28: 350-356 (1956).
118. Lang, S., Katsiwela, E., and Wagner, F., "Antimicrobial Effects of Biosurfactants", **Fat. Sci. Technol.**, 91: 363-366 (1989).
119. Claus, G.W., "Understanding Microbes: A laboratory textbook for microbiology", **W. H. Freeman and Compan.**, New York, 547 (1989).
120. Oh, K. H., and Tuovinen, O. H., "Degradation of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid by mixed cultures of bacteria", **J. Ind. Microbiol.**, 6: 275-278 (1990).
121. King, E. O., Ward, M. K., and Raney, D. E. "Two Simple Media for The Demonstration of Pyocyanin and Fluorescin", **J. Lab. Clin. Med.**, 44: 301-307 (1954).
122. Peix, A., Rivas, R., Santa-Regina, I., Mateos, P. F., Martínez-Molina, E. Rodríguez-Barrueco, C., and Velázquez, E. "*Pseudomonas lutea* sp. nov., a novel phosphate-solubilizing bacterium isolated from the rhizosphere of grasses" **Int J Syst Evol Microbiol** 5: 847-850 (2004).

123. Burton, M. O., Campbel, J. J. R., and Eagles, B. A. "The Mineral Requirements for Pyocyanin Production", *Can. J. Res.*, 26: 15-22 (1948).
124. Georgia, F. R., and Poe, C. F. "Study of Bacterial Fluorescence in Various Media. I. Inorganic Substance Necessary for Bacterial Fluorescence", *J. Bacteriol.*, 22:349-361 (1931).
125. Kodaka, H., Iwata, M., Yumoto, S., and Kashitani, F., 'Evaluation of a new agar medium containing cetrimide, kanamycin and nalidixic acid for isolation and enhancement of pigment production of *Pseudomonas aeruginosa* in clinical samples', *J. Basic Microbiol.*, 43: 407-413 (2003).
126. Fett, W.F. Wells, J.M. Cescutti, P. and Wijey, C. "Identification of Exopolysaccharides Produced by Fluorescent Pseudomonads Associated with Commercial Mushroom (*Agaricus bisporus*) Production", *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 513-517 (1995).
127. Osman, S.F. Fett, W.F. and Fishman, M.L. "Exopolysaccharides of The Phytopathogen *Pseudomonas syringae* pv. *Glycinea*", *J. Bacteriol.*, 166: 66-71 (1986).
128. De Vuyst, L., Degeest, B., 'Heteropolysaccharides from lactic acid bacteria', *FEMS Microbiol. Rev.*, 23: 153-177 (1999).
129. Looijesteijn, P.J., Boels, I., Kleerebezem, M., Hugenholtz, J., 'Regulation of Exopolysaccharide production by lactococcus lactis ssp. cremoris by the sugar sources', *Appl. Environ. Microbiol.*, 65: 5003-5008 (1999).
130. Tallon, R., Bressollier, P., Urdaci, M.C. 'Isolation and characterization of two exopolysaccharides produced by *Lactobacillus plantarum* EP56', *Research Microbiol.*, 154, 705-712 (2003).
131. Sıdal, U., Kolankaya, N., Kurtonur, C., 'Pseudomonas sp. ile zeytinyağı fabrikası atığından biyosüpfektan eldesi' *Turk J. Biol.*, 20:611-625 (2000).
132. Okay, S. O., Morkoç, E. ve Tüfekçi, V., "Fitoplanktonların üreme kinetiklerinin besin elementlerinin, atık suların ve zehirli maddelerin etkisi altında kesikli ve sürekli sistemlerde incelenmesi, **Proje No: 15.1.001** Çevre Müh. Bölümü Tubitak-Mam. Gebze-Kocaeli, 165, (1994).
133. Hamilton et al., 1989 Hamilton, P. b., Lean, D. R. S., Jackson, G. S., Kaushik, N. K., Solomon, K. R., "Effect of two applications of atrazine on the water quality of freshwater enclosures", *Environ. Pollut.*, 60: 291-304 (1989).
134. Chang, B. V., Wu, W. B., and Yuan, S. Y., "Biodegradation of Benzene, Toluene and Other Aromatic Compounds by *Pseudomonas* sp. D8", *Chemosphere*, 35: 2807-2815 (1997).

135. Khalil, A. B., "Isolation and Characterization of 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid Degrading Organisms from Soil in Jordan Valley", *Biotechnology*, 2: 73-75 (2003).
136. Mulbry, W. and Kearney, P.C. "Degradation of Pesticides by Microorganism and The Potential for Genetik Manipulation", *Reviews*, 334-246 (1991).
137. Singleton I., "Microbial Metabolism of Xenobiotics Fundamental and Applied Research", *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 59: 9-23 (1994).
138. Leahy, J. G., and Colwell, R. R., "Microbial Degradation of Hydrocarbons in The Environment", *Microbiol. Rev.*, 54: 305-315 (1990).
139. Farah, M. A., Ateeq, B., Ali, M. N., Sabir, R., and Ahmad, W., "Studies on Lethal Concentrations and Toxicity Stres of Some Xenobiotics on Aquatic Organisms", *Chemosphere*, 55: 257-265 (2004).
140. Babu, G. R., Wolfram, J. H., Marian, J. M., Chapatwala, K. D., 'Pseudomonas marginalis: Its Degradative Capability on Organic nitriles and amides', *Appl. Microbiol. Bitechol.*, 43: 739-745 (1995).
141. Clarkson, W. W., Yang, C., and Harker, A. R. '2,4-D Degradation in Monoculture Biofilm Reactors', *Wat. Rse.*, 27: 1275-1284 (1993).
142. Greer, W. C., Hawari, J., and Samson, R. 'Influence of Environmental Factors on 2,4-D Degradation by *Pseudomonas cepecia* Isolated from Peat', *Arch. Microbiol.*, 154: 317-322 (1990).
143. Atlas, R. M., "Microbial Degradation of Petroleum Hydrocarbons, An Environmental Perspective", *Microbiol. Rev.*, 45: 180-209 (1981).
144. Soulas, G. "Mathematical Model for Microbial Degradation of Pesticides in The Soil", *Soil. Biol. Biochem.*, 14: 107-115 (1981).
145. Cullimore, D. R. "The Enumaration of 2,4-D Degraders in Sasketchewan Soils", *Weed Sci.*, 29: 440-443 (1981).
146. Sandman, E. R. I. C., Loos, M. A., and van Dyk, L. P., "The microbial degradation of 2,4-D in soil", *Rev. Env. Cont. and Toxicol.*, 101:1-53 (1988).
147. Musarrat, J., Bano, N., and Rao, R. A. K., "Isolation and Characterization of 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid- Catabolizing Bacteria and Their Biodegradation Efficiency in Soil", *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 16: 495-497 (2000).

148. Fusconi, R., and Godinho, M. J. L., "Screening Exopolysaccharide-Producing Bacteria From Sub-Tropical Polluted Groundwater", *Braz. J. Biol.*, 62: 363-369 (2002).
149. Wolfaardt, G. M., Lawrence, J. R., Headly, J. V., Robarts, R. D. and Caldwell, D. E., "Microbial exopolymers provide a mechanism for bioaccumulation of contaminants", *Microb. Ecol.*, 27: 279-291 (1994).
150. Wolfaardt, G. M., "Bioaccumulation of the herbicide diclofop in extracellular polymers and its utilization by a biofilm community during starvation", *Appl. Environ. Microbiol.*, 61: 152-158 (1995).
151. Nichols, C. M., Bowman, J. P. and Guezennec, J. "Effect of incubation temperature on growth and production of exopolysaccharides by an Antarctic Sea ice bacterium Grown in batch culture" *Appl. Environ. Microbiol.*, 71: 3519-3523 (2005).
152. Saadoun, I., "Recovery of *Pseudomonas* spp. from Chronically Fuel Oil-Polluted Soils in Jordan and The study of Their Capability to Degrade Short Chain Alkanes", *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 20: 43-46 (2004).
153. Rahman, K. S. M., Rahman, T., Lakshmanaperumalsamy, P., and Bana, I. "Occurrence of Crude Oil Degrading Bacteria in Gasoline and Diesel Station Soils", *J. Basic Microbiol.*, 42: 286-293 (2002).
154. Marchal, R., Penet, S., Solano-Serena, F., and Vandecasteele, J. P., "Gasoline and Diesel Oil Biodegradation", *Oil & Gas Sci. Technol.*, 58: 441-448 (2003).
155. Ridgway, H. D., Safarik, J., Phipps, D., Carl, P., and Clark, D., "Identification and Catabolic Activity of Well-Derived Gasoline-Degrading Bacteria from a Contaminated Aquifer", *Appl. Environ. Microbiol.*, 56: 3565-3575 (1990).
156. Cunha, C. D., and Leite, S. G., "Gasoline, Biodegradation in Different Soil Microcosms", *Brazilian J. Microbiol.*, 31: 45-49 (2000).
157. Leahy, J. G., Tracy, K. D., and Eley, M. H. "Degradation of Mixtures of Aromatic and Chloroaliphatic Hydrocarbons by Aromatic hydrocarbon-Degrading Bacteria", *FEMS Microbiol. Ecol.*, 43: 271-276 (2003).
158. Babaarslan, Ç., Abuhamed, T., Mehmetoglu, Ü. "Biodegradation of BTEX Compounds by A Mixed Culture Obtained from Petroleum Formation Water", *Energy Sources*, 25: 733-742 (2003).
159. Arafa, M. A., "Biodegradation of Some Aromatic Hydrocarbons (BTEXs) by a Bacterial Consortium Isolated from Polluted Site In Saudi Arabia", *Pakistan j. Biolog. Sci.*, 6: 1482-1486 (2003).

160. Nichols, W. W. Evans, M. J., Slack, M. P. and Walmsley, H. L., "The penetration of antibiotics into aggregates of mucoid and nonmucoid *Pseudomonas aeruginosa*", **J. Gen Microbiol.**, 135: 1291-1303 (1989).
161. Slack, M. P. and Nichols, W. W., "Antibiotic penetration through bacterial capsules and exopolysaccharides", **J. Antimicrob Chemother.**, 10: 368-372 (1982).
162. Hino, S., Watanabe, K. and Takahashi, N., "Isolation and characterization of slime-producing bacteria capable of utilizing petroleum hydrocarbons as a sole carbon source", **J. Ferment. Bioeng.**, 84 (6): 528-531 (1997).
163. Geesey, G. G., Lewandowski, Z. and Flemming, H., "Biofouling and biocorrosion in industrial water systems", **CRC Pres.**, Boca Raton, FL, 121 (1994).
164. Fusconi, R., and Godinho, M. J. L., "Screening Exopolysaccharide-Producing Bacteria From Sub-Tropical Polluted Groundwater", **Braz. J. Biol.**, 62: 363-369 (2002).
165. Robertson, E. B., and Firestone, M. K. "Relationship Between Desiccation and Exopolysaccharide Production in soil *Pseudomonas* sp.", **Appl. Environ. Microbiol.**, 58: 1284-1291 (1992).
166. Priester, J. H., Olson, S. G., Webb, S. M., Neu, M. P., Hersman L. E., and Holden, P. A. 'Enhanced exopolymer production and chromium stabilization in *Pseudomonas putida* unsaturated biofilms', **Appl. Environ. Microbiol.** 72: 1988-1996 (2006).
167. Royan, S., Parulekar, C. and Mavinkurve, S., "Exopolysaccharides of *Pseudomonas mendocina* P<sub>2d</sub>", **Lett. Appl. Microbiol.**, 29: 342-346 (1999).
168. Osman, S. F., and Fett, W. F. 'Structure of an acidic exopolysaccharide of *Pseudomonas marginalis* HT041B' **J. Bacteriology**, 171: 1760-1762 (1989).
169. Guerra-Santos, L. Kappeli, O., Fiechter, A. "*Pseudomonas aeruginosa* Biosurfactant Production in Continuous Culture with Glucose as Carbon Source", **Appl. Environ. Microbiol.**, 48: 301-305 (1984).
170. Mata-Sandoval J. C., Karns J., and Torrents A., "High-performance Liquid Chromatography Method for The Characterization of Rhamnolipid Mixtures Produced by *Pseudomonas aeruginosa* UG2 on Corn oil", **J. Chromatography A**, 864: 211-220 (1999).
171. Robert, M., Mercade, M. E., Bosch, M. P., Para, J. L., Espuny, M. J., Manresa, M. A., and Guinea, J., "Effect of the carbon source on biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* 44T1", **Biotechnol. Lett.**, 11: 871-874 (1989).

172. Zhang, G., Wu, Y., Qian, X, and Meng, Q. “Biodegradation of Crude Oil by *Pseudomonas aeruginosa* in The Presence of Rhamnolipids”, ***J. Zhejiang Un. Sci.***, 6B. 725-730 (2005).
173. Syldatk, C., and Wagner, F. “Production of Biosurfactants. In Biosurfactants and Biotechnology. (ed.) N. Kosaric, W. L. Cairns and N. C. C. Gray, M. Dekker, ***New York***, 89-120 (1987).
174. Ramana, K. V., and Karanth, N. G. “Production of Biosurfactants by The Resting Cells of *Pseudomonas aeruginosa* CFTR-6”, ***Biotech. Lett.***, 11: 437-442 (1989a).
175. Ramana, K. V., and Karanth, N. G. “Factors Affecting Biosurfactant Production Using *Pseudomonas aeruginosa* CFTR-6 Under Submerged Conditions”, ***J. Chem. Tech. and Biotech.***, 45: 249-258 (1989b).
176. Mercadé, M. E., Manresa, M. A., Robert, M., Espuny, M. J., Andrés, C. de, Guinea, J. “Olive Oil Mill Effluent (OOME). New Substrate for Biosurfactant Production”, ***Bioresource Technol.***, 43: 1-6 (1993).
177. Abu-Ruwaida, A. S., Banat, I. M., Haditirto, S., Salem, A., Kadri, M., “Isolation of biosurfactant producing bacteria; product, characterization and evaluation”, ***ACTA Biotechnologica***, 11: 315-324 (1991).
178. Tuleva B. K., Ivanov, G. R., and Christova, N. E. “Biosurfactant Production by a New *Pseudomonas putida* Strains” ***Z. Naturforsch.***, 57c: 356-360 (2002).
179. Raza, Z. A., Khan, M. S., Khalid, Z. M., and Rehman, A., “Production of Biosurfactant Using Different Hydrocarbons by *Pseudomonas aeruginosa* EBN-8 Mutant”, ***Z. Naturforsch.***, 61c: 87-94 (2006).

## ÖZGEÇMİŞ

### KİŞİSEL BİLGİLER

Soyadı, adı: ONBAŞILI, Dilşad

Uyruğu: T.C.

Doğum tarihi ve yeri: 10.04.1972 Kayseri

Medeni hali: Bekar

Telefon: 0 (312) 202 12 01

Fax: 0 (312) 212 22 79

Email: dilsad@gazi.edu.tr

### Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet Tarihi
Doktora	Gazi Üniversitesi/Biyoloji Bölümü	2006
Yüksek Lisans	Gazi Üniversitesi/Biyoloji Bölümü	1999
Lisans	Ankara Üniversitesi/Biyoloji Bölümü	1994
Lise	Atatürk Lisesi	1989

### İş Deneyimi

Yıl	Yer	Görev
1997	Gazi Üniversitesi	Araştırma Görevlisi

### Yabancı Dil

İngilizce

### Yayınlar:

1. Açık L , Samancı B. **Onbasili D**, 1999, The determination of genetical distances among certain selfed maize generations (F3 , F4 and F5 ) by using PCR method, J. of Inst. of Sci. and Tech of Gazi Uni., 12 (3): 837-847.



**Posterler**

1. Aık L., Samancı B, **Onbasili D**, 1999, The Determination of Genital Distances Among Certain Selfed Maize Generations (F3 , F4 and F5 ) by Using PCR Method, The First International Biosciences Days, Antalya, Türkiye. (Poster Sunumu).
2. Oguz Can Turgay, Gken Yuvalı, Sahlan Öztürk, **Dilsad Onbasili**, Belma Aslım, 2006, Characterization of Microbial Population Changes in a Crude Oil Polluted Soil; Dynamics of Hydrocarbon Degrading Bacteria, International Soil Meeting (ISM) on ‘Soils Sustaining Life on Earth’, Managing Soil and Technology, May 22-26, 2006, Őanlıurfa-TURKEY. (Poster Sunumu).
3. **Onbasili D**, Öztürk, Ő., Aslım, B., 2006, Toxicity of three common herbicides used in Turkey on *Chrococcus* sp. H8, *Scenedesmus* sp. S59 and *Artemia salina*, 6th International Congress of Turkish Society of Toxicology, Antalya-TURKEY, November 2–5, 2006. (Poster Sunumu).

**Hobiler**

Kayak, Tenis, Scuba Diving