

T.C.

MUĞLA ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

135 910

PSEUDOMONAS VE PSEUDOMONAS İLİŞKİLİ BAZI GENUSLARIN  
FENOTİPİK VE MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ÖZGÜR CEYLAN

DANIŞMAN: Yrd.Doç.Dr. AYSEL UĞUR

HAZİRAN, 2003

MUĞLA

135 910

T.C.

MUĞLA ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

PSEUDOMONAS VE PSEUDOMONAS İLİŞKİLİ BAZI GENUSLARIN  
FENOTİPİK VE MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ÖZGÜR CEYLAN

Fen Bilimleri Enstitüsünce

“Yüksek Lisans”

Diploması Verilmesi İçin Kabul Edilen Tezdir.

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih :

Tezin Sözlü Savunma Tarihi : 03.07.2003

Tezin Danışmanı : Yrd.Doç.Dr. Aysel UĞUR

Jüri Üyesi : Prof.Dr. İsmail KARABOZ

Jüri Üyesi : Yrd.Doç.Dr. Nazime MERCAN

Enstitü Müdürü : Prof.Dr.Mustafa DİLEK

HAZİRAN,2003

MUĞLA

## YEMİN

Yüksek lisans tezi olarak sunduğum “Pseudomonas ve Pseudomonas İlişkili Bazı Genusların Fenotipik ve Moleküler Karakterizasyonu” adlı çalışmanın, tarafımdan bilimsel ahlak ve geleneklere aykırı düşecek bir yardıma başvurulmaksızın yazıldığını ve yararlandığım eserlerin Kaynakça’da gösterilenlerden oluştuğunu, bunlara atıf yapılarak yararlanmış olduğumu belirtir ve bunu onurumla doğrularım.

11 / 06 / 2003

  
ÖZGÜR AÇILAYAN

## TUTANAK

Muğla Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü'nün .../.../..... tarih ve ..... sayılı toplantısında oluşturulan jüri, Lisansüstü Eğitim-Öğretim Yönetmeliği'nin .... maddesine göre, Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans öğrencisi Özgür CEYLAN'ın "Pseudomonas ve Pseudomonas İlişkili Bazı Genusların Fenotipik ve Moleküler Karakterizasyonu" adlı tezini incelemiş ve aday 03 / 07 / 2003 tarihinde saat 14<sup>00</sup>'de jüri önünde tez savunmasına alınmıştır.

Adayın kişisel çalışmaya dayanan tezini savunmasından sonra 15 dakikalık süre içinde gerek tez konusu, gerekse tezin dayanağı olan anabilim dallarından sorulan sorulara verdiği cevaplar değerlendirilerek tezin kabul olduğuna oybirliği ile karar verildi.

Tez Danışmanı

Yrd.Doç.Dr. Aysel UĞUR



Üye

Üye

Üye

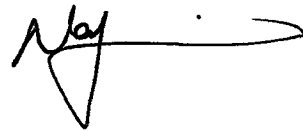
Prof.Dr. İsmail KARABOZ



Yrd.Doç.Dr. Aysel UĞUR



Yrd.Doç.Dr. Nazime MERCAN



## ÖNSÖZ

Çalışmam boyunca her türlü yardımını ve yakın ilgisini gördüğüm, hiçbir konuda desteğini esirgemeyen, akademik çalışmalarında beni daima cesaretlendiren, disiplini ve hoşgörüsü ile kendime her zaman örnek alacağım Sayın Hocam Yrd. Doç. Dr. Aysel UĞUR'a en derin saygı ve şükranlarımı sunar teşekkürü bir borç bilirim.

Yine laboratuvar çalışmalarım sırasında bilgi ve yardımlarını esirgemeyen Yrd. Doç. Dr. Nurettin ŞAHİN'e teşekkürlerimi sunarım.

Her konuda olduğu gibi tez çalışmamda da büyük ilgi ve yardımlarıyla bana destek olan çalışma arkadaşlarım Arş.Gör. Havser ERTEM ve Arş.Gör. Fatma AYDOĞMUŞ'a teşekkür ederim.

Ayrıca çalışmalarımda bana destek veren Uzm. Aysu BESLER ve Uzm. Ali Rıza GİRGIN'e sonsuz teşekkürler.

Her konuda olduğu gibi abstract bölümünün yazımında da yardımını esirgemeyen Yrd. Doç.Dr. Şevki KÖMÜR'e de teşekkürlerimi sunarım.

Manevi desteklerini her zaman üzerimde hissettiğim, bu konuda kendilerine çok şey borçlu olduğum sayın anne ve babama, sevgili kardeşime ve değerli aile büyüklerime yanımda oldukları ve bana güvendikleri için teşekkürü bir borç bilirim.

PSEUDOMONAS VE PSEUDOMONAS İLİŞKİLİ BAZI GENUSLARIN  
FENOTİPİK VE MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU

(Yüksek Lisans Tezi)

CEYLAN Özgür

MUĞLA ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Haziran, 2003

ÖZET

Çalışmada, Muğla Üniversitesi Kültür Koleksiyonundan *Pseudomonas* ve *Pseudomonas* generisi ile ilişkili bazı genoslara ait olabileceği önidentifikasyon testleriyle ortaya çıkarılmış olan 40 adet bakterinin, yapılan identifikasyon çalışmaları sonucu 28 adedi *Pseudomonas* ve *Pseudomonas* generisi ile ilişkili bazı genoslara ait türler olarak belirlenmiş ve bu suşların fenotipik ve moleküler karakterizasyonu yapılmıştır.

Bu bakterilerin tür identifikasyonları, API 20 NE test kitleri ve ek bazı biyokimyasal testlerle yapılmıştır. İdentifikasyon sonuçlarına göre 11 adet *Stenotrophomonas maltophilia*, 5 adet *Chryseomonas luteola*, 4 adet *Pseudomonas fluorescens*, 3 adet *Pseudomonas putida*, 2 adet *Sphingomonas paucimobilis*, 2 adet *Methylobacterium mesophilicum* ve 1 adet *Pseudomonas stutzeri* tespit edilmiştir. Bu suşların enzimatik aktiviteleri, API ZYM enzim test kitleri ile saptanmıştır. Suşların

tamamının esteraz ve lösin arilamidaz enzimlerini ürettikleri,  $\beta$  -glukuronidaz,  $\alpha$ -mannosidaz ve  $\alpha$ -fukosidaz enzimlerini ise üretmedikleri tespit edilmiştir. Lipaz enzimini üreten tek suş *S.maltophilia* MU63 olarak tespit edilmiştir.

Suşların antibiyotiklere duyarlılıkları disk difüzyon metodu ile tespit edilmiştir. Elde edilen sonuçlar NCCLS (National Committee for Clinic Laboratory Standarts, M 100-S9) standartlarına göre değerlendirilmiştir. Suşların tamamı penisilin, ampisilin, sefalotin, seftriakson ve aztreonam antibiyotiklerine dirençli bulunmuştur. *S.maltophilia* MU64 çalışmada kullanılan tüm antibiyotiklere dirençli bulunmuştur. Aminoglikozid grubu antibiyotikler, çalışmada kullanılan *Pseudomonas* genusuna ait türlerin tamamına karşı etkili bulunmuşlardır. Ayrıca antibiyotiklerin büyük bir kısmına karşı dirençli olarak tespit edilen *S.maltophilia* suşlarına karşı en yüksek etkiyi bu suşların % 63.7'sine etkili bulunan trimetoprim-sulfametaksazol antibiyotiği göstermiştir.

Suşların ağır metallere karşı dirençlilikleri agar dilüsyon metodu ile belirlenmiştir. Suşların tamamı çinkoya dirençli bulunmuştur. *M.mesophilicum* suşlarının ağır metallere karşı yüksek bir toleransa sahip olduğu görülmüştür. Ayrıca *M.mesophilicum* suşları dışındaki tüm suşların kobalt, civa ve gümüşe duyarlı oldukları saptanmıştır. Kurşun sadece *S.paucimobilis* MU 67 suşu için toksik olarak tespit edilmiştir.

Suşların plazmid DNA profilleri hot alkalın lizis metodu ile çıkarılmıştır. Elde edilen profillere göre sadece 5 adet suşun plazmid içerdiği ve bu plazmidlerin moleküler ağırlıklarının 0.89 – 21.59 kb arasında olduğu saptanmıştır. Plazmid içeren 5 suştan 3'ü *S.maltophilia* türüne ait suşlar olup *S.maltophilia* MU 52 suşunun 0.89, 2.35, 5.71, 6.24 ve 13.86 kb moleküler ağırlıklarında 5 adet, *S.maltophilia* MU 63 suşunun 2.57 ve 6.24 kb moleküler ağırlıklarında 2 adet ve *S.maltophilia* MU 69 suşunun 13.86 kb moleküler ağırlığında bir adet plazmid içerdiği tespit edilmiştir. Plazmid içeren diğer suşlardan, *P.fluorescens* MU 87 suşunun 12.68 ve 21.59 kb, *M.mesophilicum* MU 141 suşunun ise 11.61 ve 21.59 kb moleküler ağırlıklarında 2 adet plazmid içerdikleri tespit edilmiştir.

Çalışma suşlarının toplam hücre proteinleri Pot ve ark.'nın metoduna göre ekstrakte edilmiş, proteinlerin moleküler ağırlıklarına göre ayırımı SDS-PAGE tekniği ile Laemmli'ye göre yapılmıştır. Çalışma suşları kendi aralarında gruplandırılarak yürütülmüş ve protein bantlarının karşılaştırılmasına dayalı olarak SPSS programı kullanılarak dendrogramları çıkarılmıştır. Suşların taşıdıkları protein bantlarına bağlı olarak tespit edilen benzerliklerin bu suşların diğer özelliklerinde de var olup olmadığı incelenmiş ve genel olarak bu sonuçlarda paralellik tespit edilmiştir.





PHENOTYPIC AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF  
PSEUDOMONAS AND SOME PSEUDOMONAS RELATED GENERA

(Ph.M.Thesis)

CEYLAN Özgür

MUGLA UNIVERSITY  
INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY

June, 2003

ABSTRACT

In this study, 40 strains which are thought to belong to *Pseudomonas* and *Pseudomonas* related genera were taken from Mugla University Collection of Culture and 28 of these strains were identified that they belonged to *Pseudomonas* and *Pseudomonas* related genera, and fenotypical and molecular characterizations of these strains were made.

These bacteria have been identified by API 20 NE test kits and additional some biochemical tests. According to the results of these tests, 11 were identified as *Stenotrophomonas maltophilia*, 5 *Chryseomonas luteola*, 4 *Pseudomonas fluorescens*, 3 *Pseudomonas putida*, 2 *Sphingomonas paucimobilis*, 2 *Methylobacterium mesophilicum* and 1 *Pseudomonas stutzeri*. The enzymatic activities of those strains were determined by API ZYM enzyme kits. It was found that all these strains produced esterase and leucine arylamidase and didn't produce

$\beta$ -glucuronidase,  $\alpha$ -mannosidase and  $\alpha$ -fucosidase enzymes. It was also determined that the only strain producing the lipase enzyme was *S.maltophilia* MU 63.

The susceptibility level of these strains to antibiotics was identified with disc diffusion method. The results obtained were evaluated according to National Committee for Clinic Laboratory Standarts (NCCLS, M100-S9) guidelines. It was found out that all strains were resistant to penicilin, ampicillin, cephalothin, ceftriaxone and aztreonam antibiotics. *S.maltophilia* MU 64 was found to be resistant to the all antibiotics which were tried. Group aminoglycoside antibiotics were effective to the species belonging to *Pseudomonas* genera. In addition, trimethoprim+sulphamethoxazole was effective to 63.7 % of *S.maltophilia* strains which are very resistant to most of the antibiotics used in this study.

The heavy metal resistance level of these strains were determined with agar dilution method. All these strains were found to be resistant to zinc. It was also observed that *M.mesophilicum* strains have high level of tolerance to heavy metals used in this research. Except for *M.mesophilicum* strains, all strains were identified that they were susceptible to cobalt, mercury and silver. It was also found out that lead was toxic for *S.paucimobilis* MU 67.

The plasmid DNA profiles of the strains were prepared according to a previously described modification of hot alkaline lysis method. According to the profiles obtained only 5 strains were found to contain plasmid, and the molecular weights of these plasmids were observed between 0.89 – 21.59 kb. Of 5 strains containing plasmid, 3 were found to belong to *S.maltophilia* strains and it was also observed that *S.maltophilia* MU 52 contains 5 plasmids with molecular weights of 0.89, 2.35, 5.71, 6.24 and 13.86 kb, *S.maltophilia* MU 63 2 plasmids with molecular weights of 2.57 and 6.24 kb, *S.maltophilia* MU 69 1 plasmid with molecular weight of 13.86kb, respectively. The other strains of containing plasmid, *P.fluorescens* MU 87 contained 2 plasmids with molecular weights of 12.68 and 21.59 kb, *M.mesophilicum* MU 141 contained 2 plasmids with molecular weights 11.61 and 21.59 kb, respectively.

Whole-cell bacterial proteins of the strains studied were extracted with Pot et al. method and the classification of molecular weights of proteins was made with SDS-PAGE technique as applied by Laemmli et al. All the strains in the study were grouped and run among themselves in one-dimensional gels. Dendrograms were taken based on the comparisons of protein bands by using SPSS program. The similarities to see determined depending on the protein bands the strains possess were studied if they were available in the other characteristics of the strains and it was found out that the results obtained were compatible with the other tests in the study.



## İÇİNDEKİLER

	SAYFA
ÖNSÖZ .....	I
ÖZET .....	II
ABSTRACT .....	V
İÇİNDEKİLER .....	VIII
TABLULARIN LİSTESİ .....	XII
ŞEKİLLERİN LİSTESİ .....	XIV
KISALTMALAR .....	XVI

1. GİRİŞ .....	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ .....	4
2.1. Bakteriyel Sınıflandırma .....	4
2.1.1. Bakteriyel Sınıflandırmada Temel Gelişmeler .....	4
2.1.2. Bakteriyel Sınıflandırmada Kullanılan Özellikler (Taksanomik Karakterler) .....	9
2.1.2.1. Fenotipik Metotlar .....	11
2.1.2.1.1. Klasik fenotipik metotlar .....	12
2.1.2.1.2. Kemotaksonomi .....	13
2.1.2.1.3. Diğer fenotipik metotlar .....	14
2.1.2.2. Fenotipik Metotlarda Kullanılan İdentifikasyon Anahtarları ve Teşhis Tabloları .....	15
2.1.2.3. Fenotipik Metotlarda Kullanılan Mikrobiyal İdentifikasyon Sistemleri .....	16
2.1.2.4. Genomik Metotlar .....	16
2.1.2.4.1. % G+C Oranı .....	18
2.1.2.4.2. Hibridizasyon .....	19
2.1.2.4.3. Tm noktası (Melting temperature) .....	19
2.1.2.4.4. rRNA analizleri .....	20
2.1.2.4.5. DNA-rRNA hibridizasyonu .....	21

2.1.2.4.6. Oligonükleotit kataloglarının kullanılması .....	21
2.1.2.4.7. Restriction endonükleaz analizleri .....	22
2.2. Pseudomonas Genusu ve Özellikleri .....	22
2.2.1. Pseudomonasların Sınıflandırılmasının Tarihi Gelişimi .....	22
2.2.2. Habitatları .....	24
2.2.3. Morfoloji ve Hücre Yapısı .....	26
2.2.4. Pigmentasyon .....	27
2.2.4.1. Floresans veren pigmentler .....	28
2.2.4.2. Fenazin pigmentler .....	28
2.2.4.3. Lemonnierin .....	29
2.2.4.4. Karotenoidler .....	29
2.2.4.5. Diğer pigmentler .....	29
2.2.5. Gelişme Ortamları ve Fizyolojik Özellikleri .....	30
2.2.6. Genetik Yapısı .....	31
2.2.7. Plazmidler .....	33
2.2.8. Antimikrobiyal Ajanlara Dirençlilik .....	34
2.2.9. Mutualistik ve Antagonistik İlişkiler .....	35
2.3. Bazı Pseudomonas Türleri .....	36
2.3.1. <i>Pseudomonas fluorescens</i> .....	36
2.3.1.1. Tarihçesi .....	36
2.3.1.2. Genel Özellikleri .....	37
2.3.2. <i>Pseudomonas putida</i> .....	39
2.3.2.1. Tarihçesi .....	39
2.3.2.2. Genel Özellikleri .....	39
2.3.3. <i>Pseudomonas stutzeri</i> .....	40
2.3.3.1. Tarihçesi .....	40
2.3.3.2. Genel Özellikleri .....	41
2.4. Pseudomonaslardan Ayrılan Yeni Genuslara Ait Türler .....	42
2.4.1. <i>Stenothrophomonas maltophilia</i> .....	42
2.4.1.1. Tarihçesi .....	42
2.4.1.2. Genel Özellikleri .....	43
2.4.2. <i>Chryseomonas luteola</i> .....	44

2.4.2.1. Tarihçesi .....	44
2.4.2.2. Genel Özellikleri .....	45
2.4.3. <i>Sphingomonas paucimobilis</i> .....	46
2.4.3.1. Tarihçesi .....	46
2.4.3.2. Genel Özellikleri .....	46
2.4.4. <i>Methylobacterium mesophilicum</i> .....	47
2.4.4.1. Tarihçesi .....	47
2.4.4.2. Genel Özellikleri .....	48
<b>3. MATERYAL VE METOT .....</b>	<b>49</b>
3.1. Materyal .....	49
3.1.1. Bakteriler .....	49
3.1.2. Çalışmada Kullanılan Besiyerleri .....	51
3.1.3. Hidrojen Peroksit (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) .....	52
3.1.4. İdentifikasyonda Kullanılan Test Kitleri .....	52
3.1.4.1. API 20 NE (Biomerieux) .....	53
3.1.4.2. API ZYM (Biomerieux) .....	56
3.1.5. Antibiyogramda Kullanılan Antibiyotikler .....	57
3.2. Metot .....	60
3.2.1. İzolatların Teşhisi ve Doğrulama Deneyleri .....	60
3.2.1.1. Koloni morfolojisi .....	60
3.2.1.2. Oksidaz testi .....	60
3.2.1.3. Katalaz testi .....	61
3.2.1.4. Sitrat testi .....	61
3.2.1.5. DNase testi .....	61
3.2.2. API 20 NE İdentifikasyon Testi .....	61
3.2.3. API ZYM Enzim Testi .....	63
3.2.4. Antibiyotik Duyarlılıkları .....	64
3.2.4.1. Antibiyotik Duyarlılık Deneyleri .....	64
3.2.5. Metallere Dirençlilik Deneyleri .....	64
3.2.6. Plazmid Profillerinin Belirlenmesi .....	65
3.2.6.1. Plazmid Profillerini Belirleme Yöntemi .....	67

3.2.6.2. Plazmidlerin Büyüklüklerinin Saptanması .....	68
3.2.7. Proteinlerin Moleküler Ağırlıklarının Belirlenmesi .....	69
3.2.7.1. Total Hücre Proteinlerinin İzolasyonu .....	71
3.2.7.2. Jel Elektroforezin Yapılışı .....	72
4. <b>BULGULAR</b> .....	74
5. <b>TARTIŞMA VE SONUÇ</b> .....	91
<b>KAYNAKLAR</b> .....	110

## **KİŞİSEL BİLGİLER**



## TABLOLARIN LİSTESİ

<b>TABLO</b>	<b>SAYFA</b>
<b>Tablo 1.</b> Pseudomonasların günümüzdeki taksonomik yapıya göre gruplandırılışı .....	24
<b>Tablo 2.</b> Çalışmada kullanılan mikroorganizmalar .....	50
<b>Tablo 3.</b> API 20 NE Striplerindeki Reaksiyonlar ve Sonuçlar .....	55
<b>Tablo 4.</b> API ZYM Sistemindeki Enzimler ve Reaksiyon Sonuçları .....	58
<b>Tablo 5.</b> Çalışmada Kullanılan Antibiyotik Diskleri ve Konsantrasyonları ....	59
<b>Tablo 6.</b> Çalışılan Suşların Koloni Morfolojisi ve Bazı Fizyolojik Özellikleri .....	75
<b>Tablo 7.</b> API 20 NE İdentifikasyon Kitleriyle Yapılan Biyokimyasal Testlerin Sonuçları .....	76
<b>Tablo 8.</b> API ZYM Enzim Testi Sonuçları .....	77
<b>Tablo 9.</b> Suşların Bazı Antibiyotiklere Karşı Gösterdikleri İnhibisyon Zon Çapları .....	78
<b>Tablo 10.</b> Suşların Bazı Antibiyotiklere Karşı Gösterdikleri İnhibisyon Zon Çapları .....	79



**Tablo 11.** Suşların Standart İnhibisyon Zon Çaplarına Göre Antibiyotiklere Olan Dirençlilik ve Duyarlılıkları ..... 80

**Tablo 12.** Suşların Standart İnhibisyon Zon Çaplarına Göre Antibiyotiklere Olan Dirençlilik ve Duyarlılıkları ..... 81

**Tablo 13.** Suşların Ağır Metallere Karşı Gösterdikleri Minimum İnhibisyon Konsantrasyonları ..... 82

**Tablo 14.** Suşların Ağır Metallere Karşı Gösterdikleri Minimum İnhibisyon Konsantrasyonlarına Göre Dirençlilik ve Duyarlılıklarının Durumu ..... 83

**Tablo 15.** Çalışılan Suşların Plazmid DNA Profil ve Moleküler Ağırlıkları .... 84

## ŞEKİLLERİN LİSTESİ

- Şekil 1.** *S.maltophilia* MU 23 suşunun API 20 NE striplerindeki reaksiyonları ..... 85
- Şekil 2.** *S.paucimobilis* MU 67 suşunun API ZYM enzim kitlerindeki Reaksiyonları ..... 85
- Şekil 3.** Siprofloksasin, seftriakson, sefotaksim, gentamisin, norfloksasin, trovafloksasin antibiyotiklerinin *P.fluorescens* MU 87 suşu üzerinde oluşturdukları inhibisyon zonları ..... 86
- Şekil 4.** 1 mmol l<sup>-1</sup> konsantrasyonda CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O içeren besiyerinde *P.stutzeri* MU 70, *P.fluorescens* MU 66, *C.luteola* MU 65, *S.maltophilia* MU 25, MU 63, MU 137 suşlarının üreme durumları ..... 86
- Şekil 5.** *P.fluorescens* MU 75, MU 87, *S.maltophilia* MU 23, MU 52, MU 63, MU 69, MU 137 ve *M.mesophilicum* MU 140, MU 141 suşlarının plazmid DNA profilleri ..... 87
- Şekil 6.** *Pseudomonas* genusuna ait türlerin toplam hücre protein profilleri ..... 88
- Şekil 7.** *Pseudomonas* genusuna ait türlerin toplam hücre protein profillerine ait dendrogram ..... 88
- Şekil 8.** *C.luteola*, *S.paucimobilis* ve *M.mesophilicum* suşlarının toplam hücre protein profilleri (SDS-PAGE) ..... 89
- Şekil 9.** *C.luteola*, *S.paucimobilis* ve *M.mesophilicum* suşlarının toplam

hücre protein profillerine ait dendrogram ..... 89

**Şekil 10.** *S.maltophilia* suşlarının toplam hücre protein profilleri (SDS-PAGE) .... 90

**Şekil 11.** *S.maltophilia* suşlarının toplam hücre protein profillerine ait dendrogram ..... 90



## KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılan kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

### KISALTMALAR

<u>Kısaltma</u>	<u>Açıklama</u>
rRNA	Ribozomal ribonükleik asit
et al.	Arkadaşları
β	Beta
%	Yüzde
% G+C	Yüzde guanin sitozin oranları toplamı
DNA	Deoksiribonükleik asit
vb	Ve Benzeri
PAGE	Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi
SDS-PAGE	Sodyum dodesil sülfat- Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi
PCR	Polymerase chain reaction
LFMFA	low-frequency restriction fragment analysis
RFLP	Restriction fragment length polymorphism
PFGE	Pulsed field gel elektrofrezisi
T <sub>m</sub>	Melting temperature
TLC	İnce tabaka kromatografisi
μm	Mikrometre
PHB	Poly-β-hydroxybutyrate
PHA	Poly-β-hydroxyalkanoate
Nm	Nanometre
Hfr	Yüksek sıklıkta rekombinasyon
MIC	Minimum inhibisyon konsantrasyon
μg	Mikrogram

ml	Mililitre
CdSO <sub>4</sub>	Kadmiyum sülfat
°C	Santigrat derece
EDTA	Etilendiamintetraasetikasit
mm	Milimetre
MUKK	Muğla Üniversitesi Kültür Koleksiyonu
dk	Dakika
g	Gram
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Hidrojen Peroksit
M	Mol
HCl	Hidroklorik asit
H <sub>2</sub> O	Su
Zn	Çinko
NaCl	Sodyum klorür
α	Alfa
mcg	Mikrogram
U	Unite
mg	Miligram
µl	Mikrolitre
NCCLS	The National Committee for Clinical Laboratory
mmol	milimol
µm	mikromol
kDa	kilodalton
kb	kilobaz

## 1. GİRİŞ

*Pseudomonas* genusunun Migula tarafından tanımlanmasından günümüze kadar geçen yüzyıldan fazla sürede bu genusa ait birçok tür tanımlanmış ve bu genus üyelerinin doğada çok geniş bir yayılış alanına sahip oldukları ortaya çıkarılmıştır. Bu genus üyeleri filogenetik çeşitliliklerine bağlı olarak fenotipik özelliklerinde gösterdikleri farklılıklar nedeniyle taksonomistler için yıllardır bakteriyel sınıflandırmanın önemli bir genusu olarak çalışılmaktadır.

*Pseudomonas* genusu üyeleri, yıllar içerisinde Bergey's Manual of Systematic Bacteriology ve Bergey's Manual of Determinative Bacteriology başta olmak üzere yapılan çalışmalara bağlı olarak birçok kaynakta değişiklikler göstermişlerdir. Aerop *Pseudomonas* türlerinin karakterizasyonu 1926 yılında den Dooren de Jong tarafından yapılan çalışmalarla başlamıştır. Bu çalışmaların sonuçları büyük oranda türlerin besinsel özelliklerine bağlı olarak elde edilmiştir. Den Dooren de Jong *Pseudomonas* türlerinin çok büyük bir biyokimyasal çeşitliliğe sahip olduğunu ortaya çıkarmış olsa da bakteriyel biyokimyacıların dikkatini bu konuya çekmekte başarılı olamamıştır (Stephenson, M. 1930). Buna bağlı olarak bakteriyologlar bu genusun taksonomik yapısını açıklamak için çalışmalara ancak 40 yıl sonra başlamışlardır. Bu çalışmaların sonucunda *Pseudomonas* türleri çeşitli organik bileşikleri karbon ya da enerji kaynağı olarak kullanmalarına göre fenotipik karakterleri temel alınacak şekilde sınıflandırılmışlardır.

Günümüzde de *Pseudomonas* ve *Pseudomonas* ilişkili bazı genuslar gibi sınıflandırılmasında sorun olan bakterilerde fenotipik sınıflandırma genellikle yetersiz sonuçlar vermektedir. Fenotipik mikrobiyolojik tekniklerin bu bakterilerin tanımlanmasında kullanışlı olmasına rağmen, çoğunlukla şüpheli sonuçlar vermesi özellikle belli bir kaynağa ait olan *Pseudomonas* türlerinin spesifik ayırımında moleküler identifikasyon tekniklerinin önemini artırmaktadır.

Bu nedenden dolayı, yapılmış olan bu fenotipik sınıflandırma çalışmalarını DNA-DNA hibridizasyon çalışmaları takip etmiştir. Ancak *Pseudomonas* genusunun

sahip olduğu filogenetik çeşitliliğin ortaya çıkarılması, daha önce yapılan çalışmalarla birlikte başarılı bir şekilde sonuçlandırılmış olan nükleik asit hibridizasyon çalışmalarının sonucunda oluşan gruplar arasında rRNA benzerlik çalışmalarının yapılması ile sağlanmıştır (Palleroni, N.J., et al. 1973). Bu çalışmalar, *Pseudomonas* genusuna daha önceden yapılmış sınıflandırmanın doğrulanması yanı sıra diğer genuslarla da karşılaştırma imkanı sağlamıştır. İşte bu nedenle *Pseudomonas* genusu için yapılan sınıflandırma, tek bir genus içi sınıflandırması olmayıp birçok genus içeren bir taksonomik sistem şeklinde olmuştur. Bu sisteme bağlı olarak, *Pseudomonas* genusu rRNA homoloji gruplarına göre 5 grupta sınıflandırılmıştır. Buna göre farklı rRNA gruplarına ait türler genetik yapı olarak farklı kabul edilmektedir.

Son yıllarda, özellikle yeni teknik ve metotlarla yapılan sistematik çalışmalar, *Pseudomonas* genusuna ait bazı türlerin yeni isimlendirilen genuslara kaymasına sebep olmuştur. Bu genuslar daha önceden *Pseudomonas* cinsi içinde sınıflandırılmakla birlikte günümüzde de hala genellikle *Pseudomonas* ilişkili genuslar olarak isimlendirilmektedirler. Bu genuslardan, son yıllarda önem kazanmış ve ortaya çıkarılmış olan *Methylobacterium*, *Chryseomonas*, *Sphingomonas* ve *Stenothrophomonas* genusları çalışma kapsamındadır. Örneğin bu genuslardan *Stenothrophomonas* genusu 1993 yılında Palleroni ve Bradbury tarafından *Pseudomonas*'lardan ayrılmış, geniş yayılım alanı ve imipenem ve çoğu  $\beta$ -laktam antibiyotiklere gösterdiği çoklu dirençle önem kazanmıştır. *Chryseomonas* genusu da 1986 yılında Holmes ve ark. tarafından bulunmuş ve bu sırada sadece bir tür (*Chryseomonas polytricha*) içerirken, 1987 yılında *Pseudomonas luteola*'nın *C.luteola*'nın sinonimi olduğu ortaya çıkarılmıştır ve o günden beri bu suşun ismi *C.luteola* olarak değişmiştir. Yine *Methylobacterium* genusu 1985 yılında Bousfield ve Green tarafından yeniden düzenlenmiş ve 1988 yılında bu genusa üç yeni tür daha eklenmiştir. Ayrıca, 1977 yılında Holmes ve ark. tarafından *Pseudomonas paucimobilis* olarak isimlendirilmiş olan tür adı (Skerman, V.B.D., et al.1980) 1990 yılında Yabuuchi ve ark. tarafından *Sphingomonas paucimobilis* olarak değiştirilmiştir (Yabuuchi, E. et al. 1990).

Günümüzde bu genoslara ait bakteriler sadece uzak ilişkileri ile bilinmekte ve birkaç genel karakterleriyle gruplandırılmaktadır. Kesin bir identifikasyondan yoksun olan bu genoslara ait bakterilerin taksonomik sınıflandırılması da sorunlu olup bu çalışma ile bu konuda yeni bilgiler elde etmek amaçlanmaktadır.





## 2. KAYNAK ÖZETLERİ

### 2.1. Bakteriyel Sınıflandırma

Biyolojik sınıflandırma, organizmaların akrabalıklarına veya benzerliklerine göre gruplandırılmasıdır. Sınıflandırma, varolan ve isimlendirilmiş taksonlara veya yeni tanımlanmış organizmalara yapılır. Eğer bir takson tanımlanmış, isimlendirilmiş ve sınıflandırılmış ise ya yeni karakterlerinin ya da varolan karakterlerinin yeniden yorumlanmasıyla yeniden sınıflandırılabilir. Ancak organizma yeni ise, nomenklatur kurallarına uygun olarak isimlendirilir ve mevcut sınıflandırma içinde uygun yere yerleştirilir (Staley, J.T. ve Krieg N.R.1984).

Prokaryotik organizmalar çok fazla sayı ve büyük bir çeşitliliğe sahip organizmalardır. Bu organizmaların benzerlikleri temel alınarak, uygun bir düzene konulması veya sınıflandırılması için yapılan çalışmalar devam etmektedir (Staley, J.T. ve Krieg N.R.1984). Bu amaçla yapılmakta olan sınıflandırma, bir suşun özelliklerinin bilinmesiyle gruba ait diğer suşların da özelliklerinin bilinmesini sağlayan, organizmaların benzerlikleri veya akrabalıklarını temel alarak gruplar halinde düzenlenmesini sağlar (Staley, J.T. ve Krieg N.R. 1984, Bull et al. 1992). İşte bu nedenle sınıflandırma mikrobiyolojinin gelişmesi ve mikrobiyal çeşitliliğin ortaya çıkarılması için çok önemlidir (Bull et al.1992).

#### 2.1.1. Bakteriyel Sınıflandırmada Temel Gelişmeler

Prokaryotların sınıflandırılması, diğer canlı organizmaların çeşitli sınıflandırmaları arasında en yeni ve hareketli olanıdır. Çok küçük olmalarından dolayı çıplak gözle görülemeyen prokaryotların daha birkaç yüzyıl öncesine kadar varlığı bilinmemekteydi. Bunun yanı sıra yüksek organizmalarda gelişmiş olan morfolojik özelliklere dayalı güvenilir bir sınıflandırmanın prokaryotlarda kullanılamaması prokaryotların sınıflandırmasını güçleştirmiştir (Cowan, S.T. 1965). Bu küçük organizmaların karakterlerinin tespitindeki zorluklarla birlikte kaydadeğer

fosil kayıtlarının da bulunamaması prokaryotlarda sabit bir sınıflandırma sistemi kurulmasını zorlaştırmıştır. Fakat mikroorganizmaların genomik ve fenotipik özelliklerinin tespiti için yeni tekniklerin geliştirilmesi, bu canlılarda sağlam bir taksonomik yapının oluşturulmasına katkıda bulunmuştur (Rossello-Mora, R. ve Amann, R. 2001).

Bakterilerin sınıflandırılması, Antony Van Leeuwenhook'un (1632-1723) bakterileri keşfinden sonra, İsveçli bir botanist olan Carl von Linne (Carolus Linneaus)'nin 1764 yılında bakterileri kendi yaptığı bir sınıflamaya dahil etmesiyle başlar (Logan, N.A. 1994). Ancak ilk olarak mikroorganizmaların sistematik düzenlenmesi 1773 yılında Danimarkalı bir doğa bilimcisi olan Otto Frederick Müller tarafından ortaya konulmuştur (Staley, J.T. ve Krieg N.R. 1984; Logan, N.A. 1994). Müller, bakterileri şekillerine göre Monas ve Vibrio olarak iki genusa ayırmıştır. Bir Alman zoolog olan C.G.Ehrenberg 1828 ile 1838 yılları arasında, sınıflandırmayı biraz genişletmiş içine bakterilerin yanı sıra protozoonları da katmış ve bunların bazı özelliklerini tanımlamıştır. Ehrenberg, mikroorganizmaları 4 cinse ayırmıştır: Bacterium, Spirillum, Spirocheta, Spirodiscus. 1870 yılında Ferdinand Cohn bakterilerle cyanobacteria'lar arasındaki benzerliği ortaya çıkarmış ve "schizophytae" olarak birleştirmiştir (Schlegel, H.G. 1999; Schlegel, H.G. ve Köhler, W. 1999). Ayrıca bakterileri fizyolojileri, son ürünlerine, benzer görünümlü olan organizmaların patojenitelerine bağlı olarak altı farklı genusa ayırmıştır. Mikrobiyolojinin gelişmesindeki en önemli aşamalardan biri de izole edilen organizmaların saf kültürlerinin elde edilebilir olması olmuştur. 1872 yılında Cohn'un asistanı olan Joseph Schroeter kromojenik bakterilerin saf kolonilerini elde etmiş, 1878 yılında ise Joseph Lister süt bozan organizmaların saf kolonilerini elde etmiştir (Logan, N.A. 1994). 1881 yılında, Koch daha sonra yerini agarın alacağı katılaştırılmış jelatin besiyerinde kültürasyon tekniklerini yayımlamış ve bu Koch'unda dediği gibi medikal mikrobiyolojinin altın çağının başlangıcı olmuştur (Schlegel, H.G. 1999). Mikroorganizmaların saf kültür halinde kültüre edilmesiyle araştırmacılar organizmalar hakkındaki bilgilerini daha iyi geliştirebilmişlerdir. Elde edilen bakteriler için birçok test geliştirilmiş ve sınıflandırılmalarında bu testler

temel alınmıştır (Logan, N.A. 1994). Bu testler bu organizmaların fenotipik özelliklerinin açıklanmasını sağlamıştır.

Bakterilerin büyük çoğunluğu 19.yy.'ın sonunda açıklanmış ve 20.yy.'ın ilk 20 yılında isimlendirilmiştir. K.B.Lehman ve R.Neumann 1896 yılında birkaç yeni genusu (*Corynebacterium*, *Mycobacterium*, *Actinomyces*) "Atlas und Grundriss der Bakterien"adlı kitapta yayımlamışlardır. W.Migula 1897 yılında daha önceden açıklanan tüm bakterileri "Das System der Bakterien" adlı eserinde toplamıştır (Schlegel H.G. 1999). Bundan sonra fizyolojik karakterler bakteriyel sınıflandırmada çok etkin rol almıştır. S.N.Winogradsky ve M.W.Beijerinck gibi araştırmacılar organizmaların taşıdıkları ekolojik, fizyolojik ve biyokimyasal özelliklere göre birçok sayıda yeni genus ismi yayımlamışlardır (Schlegel H.G. 1999). S.Orla Jensen "Die Hauptlinien des Natürlichen Bakteriensystems" (Doğal Bakteriyel Sistemin Ana Hatları) adlı kitabında (1909), bakterilerde genetik ilişkilerine dayalı bir sınıflandırma sistemi kurmayı denemiştir (Schlegel, H.G. 1999; Schlegel, H.G. ve Köhler, W. 1999). Daha sonra Pringsheim (1923), Bergey's Manual'in kurucusu olan Buchanan (1925), Kluver and van Niel (1936), Prévot (1940) ve Stainer and van Niel (1941) tarafından morfolojik karakterlere dayalı birkaç sınıflandırma yayımlanmıştır (Woese C.R. 1992). Bununla birlikte, Society of American Bacteriologist tarafından 1923 yılında "Bergey's Manual of Determinative Bacteriology"nin yayımlanmasıyla bakteriler için modern bir identifikasyon anahtarı yayımlanmış oldu. Bu identifikasyon anahtarının yer aldığı yayına kadar prokaryotik sınıflandırmada tam bir görüş birliği oluşmamıştır (Staley J.T. and Krieg N.R. 1984). Ancak bu yayın prokaryotların sınıflandırmasında bir referans kaynak olmuştur (Logan, N.A. 1994). Bakterilerin modern identifikasyonuna yardım etmek amacıyla hazırlanan bu kitabın ilk baskısı ve daha sonra yayınlanan beş baskısının laboratuvarında kullanımı çok zordu. Organizmalar genus düzeyinde sınıflandırılmamışsa çok fazla yardımcı olamamaktaydı. Fosil kayıtları bakımından da yetersiz olan Bergey's Manual'in daha sonraki baskılarında bitki ve hayvanların sınıflandırılmasında kullanılan düzenlemeler benimsenmiş ve 1957 yılında yayınlanan 7. baskıda fotoototroflar en ilkel form olarak gözönüne alınmış, virüslerinde dahil edildiği baskıda riketsiyalara çok geniş yer verilmişti. 1974 yılında

yayınlanan 8. baskıda ise daha detaylı uygulamalar gözönüne alınmış ve genuslar bazı kullanışlı familyalar içinde gruplandırılmış ve yayın 19 bölüm halinde düzenlenmiştir. Bu bölümler tespit edilmiş birkaç karaktere ve kullanılan geleneksel isimlere göre ayrılmış, atasal ilişkiler gözönüne alınmamıştır. 1984 yılında “Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology” adı altında 4 ciltlik bir yayın daha çıkmıştır. 1994 yılında yayımlanan “Bergey’s Manual of Determinative Bacteriology”nin 9. baskısında bir önceki basıma çok benzemekle birlikte, yararlı filogenetik bilgilere uygun olarak, yüksek taksonomik gruplarda değişiklikler yapılmıştır. Yüksek taksonomik gruplar arasında varolan evrimsel ilişkilerin ortaya çıkarılması, fenotipik ve genotipik karakterlere bağlı olarak yapılan identifikasyon çalışmaları ile bakterilerin sınıflandırması daha anlaşılır hale gelmiştir (Logan, N.A. 1994). Bu yayınlar mikrobiyologlar arasında kriterlerin birleştirilmesi için bir temel sağlamış ve önceki yıllarda bakteriyel sınıflandırmada sıklıkla karşılaşılan nomenklatürel problemleri önlemiştir. Böylece mikrobiyologlar arasındaki bilimsel farklılıklar giderilmiş (Goodfellow M. and O’Donnell A.G. 1993) ve bakteriler için güvenilir bir isimlendirme yapılmıştır. Buna en iyi örnek, yüzyılın ilk yarısında ortaya çıkarılan ve farklı literatürlerde farklı isimlerle anılan *Pseudomonas stutzeri*’nin Bergey’s Manual of Determinative Bacteriology’nin yayımlanmasından sonra isminin netleştirilmiş ve bu şekliyle kullanılmaya başlanmış olmasıdır (Van Niel C.B. and Allen M.B. 1952).

1950’li yılların sonlarına doğru bilgisayarların gelişmesine paralel olarak numerikal taksonomi gelişmiştir. Numerikal taksonominin gelişimi, bakterilerin farklı özelliklerinden elde edilen verilerin tablolar halinde toplanmasını ve bu özelliklerin kolayca anlaşılmasını sağlamıştır. Böylece objektif metotlar kullanılarak yapılan taksonomik analizlerle amaçlanan, bilinen türlerin homojen gruplarda toplanmaları ve bu türlerin genus veya daha yüksek bir gruplandırma seviyesinde düzenlenmeleri mümkün olmuştur (Sneath, P.H.A. 1989). Numerikal taksonominin bu gelişme aşamasıyla, kemotaksonominin ortaya çıkışı ve bakterilerin özel kimyasal yapılarını oluşturan lipit, şeker, protein ve aminoasitlerin yayılımını inceleyen modern biyokimyasal analitik tekniklerden özellikle kromatografik ve

elektroforetik seperasyon metotlarının uygulanmaya başladığı aynı zamanlara rastlamaktadır (Logan, N.A. 1994).

1960'lı yılların başında, DNA'nın özellikleri hakkındaki bilgilerin artışı ve moleküler biyoloji tekniklerinin gelişmesi bakterilerin sınıflandırmasının en iyi genomların karşılaştırılmasıyla yapılabileceği fikrini ortaya çıkarmıştır. İlk olarak, DNA'nın % G+C oranı kullanılmıştır. % G+C oranı belirgin bir şekilde farklı olan bakterilerin açıkça aynı tür bakteriler olmadığı görülmekteydi. Bununla birlikte, % G+C oranı analizlerinden elde edilen değerler tek başına sadece yüzeysel karşılaştırmalara imkan tanıyor ve çoğu kez diğer metotlara ihtiyaç duyuluyordu. Bu nedenle DNA-DNA hibridizasyon teknikleri geliştirilmiştir (Brenner, D.J. et al. 1969). Bu uygulamaların bakteriyel sınıflandırmada artarak kullanılmasının yanısıra bazı mikrobiyologlar çok az bir veriyle bakterilerin sınıflandırılmasından kaygı duymuşlardır. Eğer elde edilen bu datalar son datalar olacaksa kesinlikle doğru olmalıydı (Krieg, N.R. 1988). Bu nedenle bu metotların uygulanabilirliği benzer DNA gruplarının açıklanmasında kullanılabilen fenotipik karakterlerin tespit edilmesine ve yeni izolatların kolay, hızlı ve güvenilir identifikasyonunda kullanılabilen fenotipik karakterlerin tespitine bağlıdır (Johnson, J.L. 1973). Aslında, The Committee on Reconciliation of Approaches to Bacterial Systematics (Wayne L.G. et al. 1987), bakteriyel türlerin sınıflandırılmasının fenotipik özelliklerin teşhisiyle desteklenmesi gerektiğini belirtmiştir.

1970'li yılların sonunda ise uzak ilişkili bakteriler arasındaki ilişkilerin tespiti için olağanüstü çalışmalar geliştirilmiş ve DNA-DNA hibridizasyon kataloğu yapılmıştır (De Ley J. and De Smedt J. 1975). 1980'li yılların ortasında rRNA sekans analizleri tamamlanmıştır (Stackebrandt, E. et al. 1985). rRNA sekans analizleri, filogenetik analizlerde moleküler marker'ların çok kullanışlı olabileceğini göstermiştir (Ludwig, W. and Schleifer K.H. 1994). rRNA molekülleri arasında, 16S rRNA en geniş çalışma alanına sahip olmuştur. Böylece bu moleküle ilgili birçok kullanışlı bilgi elde edilmiştir (Wheeler, M.L. et al. 1992). Örneğin Archaeobacteria veya Archaea'lar gibi farklı hücresel yapısı olan ve prokaryotların sınıflandırılmasında problem olan birçok grup hakkında kesin bilgiler elde edilmesini

sağlamıştır (Olsen, G.J. et al. 1994). rRNA sekans analizleri günümüzde rutin olarak çalışılmaya başlanmıştır. Bu çalışmalar yeni sınıflandırılmış bakteriyel türlerin birçoğunun tanımlanmasında önemli bilgiler sağlamakla birlikte yeni sınıflandırmalar için zorunlu olarak görülmemektedir (Stackebrandt, E. and Goebel, B.M. 1994). Bununla birlikte günümüzde bakteriyel taksonomistlerin büyük bir çoğunluğu 16S rRNA sekans analizlerinin prokaryotların sınıflandırılması için oldukça kesin ve yeterli bilgiler sağladığını kabul etmektedirler (Fox, G.E. et al. 1992; Martinez-Murcia, A.J. et al. 1992). Ayrıca büyük kabul gören diğer bir nokta ise tür düzeyinde yani daha düşük taksonomik grupların uygun bir şekilde sınıflandırılmasının, fenotipik ve genomik tekniklerin birarada uygulanması ile başarılabileceğidir (Vandamme, P. et al. 1996). Bu da farklı bakteriyel grupların farklı özelliklerinin gözönüne alınmasıyla daha doğru bir sınıflandırmayı sağlayacaktır (Goodfellow, M. et al. 1997).

### **2.1.2. Bakteriyel Sınıflandırmada Kullanılan Özellikler (Taksonomik Karakterler)**

Bakteriyel sınıflandırmada birkaç derece veya taksonomik grup kullanılır. Tüm prokaryot organizmalar procaryotae aleminde yer alır. Bu taksonun altında sırayla daha küçük taksonomik dereceler şöyle sıralanmaktadır. Division, Class, Order, Familya ve Genus ve Species (Staley, J.T. ve Krieg N.R. 1984).

Bakteriyel sistematikteki temel taksonomik grup türlerdir. Bakteriyel tür kavramı yüksek organizmalarda olduğu kadar kesin değildir. Bu farklılık prokaryotik organizmalar olan bakterilerin yüksek organizmalardan belirgin bir şekilde farklı olmaları nedeniyle çok şaşırtıcı değildir. Örneğin cinsiyet, bakterilerin çoğunda çoğalmanın konjugasyonla olmasına bağlı olarak net olmadığı için kullanılmaz. Yine aynı şekilde morfolojik özellikler tek başına çoğu prokaryotik organizmada çok basit olduğu için taksonomik sınıflandırma açısından pek fazla önem taşımaz ( Staley, J.T. ve Krieg N.R. 1984). Sonuç olarak yüksek organizmaların taksonomisinde kullanılan morfolojik özellikler bakteriyel taksonomide daha az önem taşımaktadır.

Tür kavramı açıkça daha subjektif bir karar vermeyi gerektirmekte ve bazı bakteriyel türlerin diğer türlere göre daha fazla fenotipik ve genotipik çeşitlilik gösterdiği görülmektedir. Genellikle değişmeyen ve sabit sonuçlar sınıflandırmada daha çok arzu edilir. Fakat pratik olarak sınıflandırma ve nomenklatürde, identifikasyonun planlanması ve yapılışındaki değişikliklere bağlı olarak özellikle tür veya cins bazında değişiklikler olabilir ve sonuçlar kalıcı bir şekilde kesin değildir. Sistemattaki sonuçlar büyük oranda kalıcı olmayıp, araştırmacılar tarafından devam eden çalışmalardan elde edilen ve bakteri taksonomisinde ortaya çıkan yeni bilgiler ışığında muhtemelen değişmektedir (Staley, J.T. ve Krieg N.R. 1984).

Günümüzde bakterilerin sınıflandırmasında genellikle bilinen birçok sayıda teknikte ortaya çıkan taksonomik grupların içerdiği çeşitliliğin incelenmesiyle elde edilen sınıflandırmanın güvenilir olabileceği hakkında görüş birliğine varılmıştır (Vandamme, P. et al. 1996). Bu ise elde edilen verilerin hem genomik hem de fenotipik kaynaklı geniş araştırmalara dayalı olmasını zorunlu kılmaktadır. Genomik bilgi nükleik asitlerden, doğrudan sekans analizlerinden veya dolaylı olarak DNA-DNA benzerlik parametrelerinden veya %G+C oranından elde edilen verilerden kazanılmaktadır. Fenotip ise genotipte bulunan kodları da içine alarak, organizmanın görünen veya diğer ölçülebilen fiziksel ve biyokimyasal özellikleri olup, genetik yapı ve çevrenin etkileşiminin bir sonucudur. Mikrobiyologlar arasında genomik bilgi yerine genotipik terimi daha yaygın olarak kullanılsa da, genotip genomdaki tüm genetik bilgileri içermeyebilir. Örneğin enzimleri (fenotip) kodlayan bilgi (genotip) nükleotit sekanslarındadır (genomik bilgi). Bu nedenle genomdan daha fazla bilgi elde edilebileceğinden genotipik yerine genomik teriminin kullanılması daha uygun bulunmaktadır (Sneath, P.H.A. 1989).

Taksonomik çalışmalarda, hem genomik hem fenotipik bilgilerin ortaya çıkarılması gerekebileceği gibi, istenilen sınıflandırma için hangi bilgilerin gerekli olduğu sonucuna da varılabilir. Prokaryotlarda yeni bir türün ortaya çıkarılması için bu bilgilerin birlikte açıklanması zorunludur (Wayne et al. 1987). Günümüzde bilinen türlerin sınıflandırması, ancak genomik yapı benzerlikleri ve çok yakın bakterilerin DNA-DNA benzerlikleri ve buna bağlı olarak taksonun teşhisine

yardımcı olan ve ona özel fenotipik özelliklerin ortaya çıkarılmasıyla yapılabilmektedir. Prokaryotların sistematigi, son yıllarda kimya, moleküler biyoloji ve bilgisayar bilimlerindeki gelişmelere bağlı olarak çok önemli gelişmeler göstermiştir (Goodfellow M. and O'Donnell A.G. 1993). Prokaryotların sınıflandırılması için rutin olarak birçok metot kullanılmaktadır. Sınıflandırmada çok yaygın ve genel olarak kullanılan teknikler fenotipik ve genomik metotlar olmak üzere iki grupta toplanmıştır.

### 2.1.2.1. Fenotipik Metotlar

Fenotip, bir anlamda genotipin ifadesidir. Bakterilerin sınıflandırılmasında moleküler metotlardan önce, organizmaların morfolojik ve fizyolojik özelliklerini ve gelişme ortamlarını temel alan fenotipik metotlar kullanılmaktaydı. Bu araştırmalar doğrudan saf kültür kullanımına ve organizmaların laboratuvar imkanlarına göre kültüvasyonuna ve bu özelliklerin analizine bağlıydı. Bu nedenle sınıflandırma bilgileri çok kolay olarak elde edilebilen heterotrof bakterilere yönelmiştir (Rossello-Mora, R. ve Amann, R. 2001).

Fenotipik metotların uygulaması mikroorganizmaların sınıflandırılmasında çok zaman alıcı çalışmalardır. Ayrıca bu çalışmalarda standart metotların kullanılması ve seçilen suşların çevresel niş ve bilinen çeşitliliği gösteren temsilciler olması oldukça önemlidir. Bu amaçla kültür koleksiyonu suşları ve en son izole edilen suşların kullanılması çok önemlidir. Bununla birlikte, prokaryotların sınıflandırılmasında, uygun testlerin kullanılması ve yaygın özelliklerin temel alındığı düzenli uygulamalar daha çok kabul görmektedir (Smibert, R.M.ve Krieg, N.R. 1994).

Bakterilerin fenotipik sınıflandırılması aşamasında, fenotipik karakterlerin organizma genomundaki bilginin çok az bir kısmını temsil etmesi gibi bazı önemli problemlerle de karşılaşmıştır. Bu problemler sınıflandırmanın çok sayıda fenotipik ve genotipik metotlara dayalı bir şekilde yapılması ile aşılmıştır (Logan, N.A. 1994).



### 2.1.2.1.1. Klasik fenotipik metotlar

Mikrobiyoloji laboratuvarlarında genellikle identifikasyon amacıyla klasik veya geleneksel fenotipik testler kullanılır. Tür ve alttürlerin üstündeki genus ve familya gibi taksonların genel olarak açıklanmasında temel alınan metotlardır (Vandamme, P. et al. 1996). Bakterilerin klasik fenotipik karakterleri morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal özelliklerini içermektedir. Bu özelliklerin bir çoğu ayrı ayrı genetik ilişkilerin ortaya çıkarılması için yetersiz kalmakla birlikte sınıflandırmada göz önüne alınması gereken faydalı bilgiler vermektedirler (Rossello-Mora, R. ve Amann, R. 2001).

#### Bakterilerin morfolojik özellikleri:

- Hücre şekli
- Endospor oluşumu
- Flagellasyon
- Boyanma reaksiyonları (Gram boyama gibi)
- Hareketlilik v.b.

#### Bakterilerin fizyolojik özellikleri:

- Farklı ısılarda gelişim
- Farklı pH'larda gelişme
- Farklı tuz konsantrasyonlarında gelişme
- Aerobik/anaerobik gelişme
- Çeşitli substratların (antimikrobiyal ajanlar vs.) varlığında gelişme

#### Bakterilerin biyokimyasal özellikleri:

- Karbohidratlardan asit üretimi
- Nitrat indirgemesi
- Çeşitli enzimlerin aktiviteleri ve varlığı (Vandamme, P. et al. 1996).

### 2.1.2.1.2. Kemotaksonomi

Fenotipik metotlar, doğrudan DNA veya RNA ile bağlantılı olmayan tüm metotları kapsadıkları için kemotaksonomik teknikleri de içine almaktadır. Kemotaksonomi terimi, bakterileri sınıflandırmak için, hücrelerin çeşitli kimyasal yapıları hakkında bilgilerin elde edilmesi amacıyla kullanılan analitik metotların uygulanması için kullanılır (Vandamme, P. et al. 1996).

Kemotaksonomi modern bakteriyel sınıflandırmanın gelişmesinde önemli kilometre taşlarından biri olarak göz önüne alınmaktadır. Bununla birlikte, elde edilen sonuçlar doğrudan organizmanın genetik yapısının bir yansıması olmakla birlikte fenotipi olarak da dikkate alınmaktadır. Fenotipik ve genomik bilgi elde edilmesinde kullanılan diğer tekniklerin yanı sıra, bazı kemotaksonomik metotlar bazı özel grup bakteriler için diğer bakterilere göre çok geniş bir uygulama alanına sahiptir (Vandamme, P. et al. 1996).

Kemotaksonomi önemli oranda amino asitler, lipitler, proteinler ve şekerlerin kendilerine has düzensiz kimyasal yapılarıyla ilişkili olup, identifikasyon ve sınıflandırmada kullanılan bir parametredir. Bununla birlikte önemli bir başka konu ise kültür ortamlarının değişmesine bağlı olarak genetik farklılıkların sonucunda kimyasal yapılarda görülen çeşitliliktir. Bu nedenle mukayeseli kemotaksonomik çalışmalarda gelişme ortamlarının standardize edilmiş olması gerekmektedir. Kültür ortamlarının standardize edilmesi en fazla kimyasal verilerin nicel analizlerinin gerektiği çalışmalarda önem kazanmaktadır (Goodfellow M. and O'Donnell A.G. 1993). Prokaryotların sınıflandırılmasında rutin olarak kullanılan tekniklerden birkaçını sayarsak;

- Hücre çeper kompozisyonu : Genellikle Gram pozitif bakterilerin sınıflandırılmasında kullanılır. Peptidoglikan ve teikoik asit analizleridir (Schleifer, K.H. and Kandler, O.,1972; Suzuki, K. et al. 1993).
- Lipitler : Yağ asiti yapısı veya % oranı, polar lipitler, lipopolisakaritler, izoprenoid quinonlar genellikle kromatografik tekniklerle analiz

edilmekte ve sınıflandırmada başarılı bir şekilde kullanılmaktadır (Suzuki, K. et al. 1993; Kampfer, P. 1998).

- Poliaminler: Polikasyonik bileşikler prokaryot hücrelerinde önemli olup görevleri tam olarak aydınlatılamamıştır (Buse, J. and Auling, G. 1988).

### 2.1.2.1.3. Diğer fenotipik metotlar

Bunların dışında tür içi çeşitliliğin ortaya çıkarılması ve suşların birbirinden ayrılması için başarılı bir şekilde kullanılan başka metotlarda vardır. Hücrelerin antijenik yapılarında (kapsül, flagella, fimbria vb.) bulunan çeşitliliğe bağlı olarak serotiplendirme (Henriksen, S.D.,1978; Rossello, R. et al. 1992), proteinlerin ekstraksiyonu ve poliakrilamid jelde ayrıştırılmasına dayalı elektroforetik protein profilleri (PAGE), gram negatif dış membran protein profilleri, multilokus enzim elektroforezleri (Selander et al. 1986; Vauterin, L. et al. 1991; Rossello, R. et al. 1992; Rossello, R. et al. 1994), lipopolisakkarit elektroforetik profilleri( DeWeger, L. et al. 1987; Rossello, R. et al. 1992; Siverio, F. et al. 1993), pirolizis mass spektrofotometre (Magee, J. 1993) gibi gelişmiş analitik teknikler bakteri hücrelerinin kimyasal yapılarını ortaya çıkarmaktadır (Goodfellow M. and O'Donnell A.G. 1993). Bu metotlar prokaryot türlerin birbirleriyle ilişkilerinin ortaya çıkarılması açısından kullanışlı tekniklerdir (Rossello, R. et al. 1992; Rossello, R. et al. 1994; Vandamme, P. et al. 1998).

Mikroorganizmalar karakterizasyon, sınıflandırma ve identifikasyon için çok zengin bir bilgi kaynağı olan 2000 farklı protein yapısı taşımaktadırlar. RNA'da bulunan kodlara göre kompleks bir yapının ürünü olan hücrel proteinlerin PAGE'i, yüksek duyarlılıkta çalışılmış bir DNA fingerprint sonucu gibi gözönüne alınabilir. Çünkü protein elektroforezleri suşların uygun ortamlarda, yüksek miktarlarda üretilmeleri sonucu standart teknikler kullanılarak yapılmaktadır. Tek boyutlu jellerde protein bantları genellikle yapısal farklılıklarına bağlı olarak elektroforetik hareketlilik gösterirler ve buna bağlı olarak ayrılırlar (Pot, B. et al. 1994).

Mikrobiyal sistematiikte protein elektroforezinin önemi son 20 yılda daha çok artmıştır (Kerstens, K. and De Ley, J. 1980; Jackman, P.J.H. 1985,1987; Kerstens, K. 1985; Vauterin, L. et al. 1993). Bu amaçla uygulanan protein elektroforezinin doğruluğu, %90-100 oranında DNA benzerliği olan suşların protein elektroforezi sonunda çok küçük farklılıklar göstermesi, %70'den az DNA homolojisi gösteren suşların ise protein bantlarının önemli benzerlikler göstermesiyle ortaya çıkarılmıştır (Owen, R.J. and Jackman, P.J.H. 1982; Vauterin, L. et al. 1993). Ayrıca hücresel proteinlerin elektroforetik ayrımının hassas bir teknik olduğu, aynı tür veya alttürlerin benzerlik çalışmalarıyla da doğrulanmıştır. Bu çalışmalarda aynı taksonlardaki suşların protein elektroforez farklılıkları genellikle çok küçük bulunmakla birlikte, protein profillerindeki çok küçük farklılıkların ise spesifik ve önemli etkileri olduğu görülmüştür (Pot, B. et al. 1994).

Son yıllarda ise denatüre edici anyonik deterjan olarak sodyum dodesil sülfat (SDS) içeren SDS-PAGE tekniği çok yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır. Bu teknik, proteinleri moleküler ağırlıklarına göre ayırmakta böylece tür düzeyinde taksonomik ilişkilerin tespiti içinde çok faydalı sonuçlar elde edilmektedir (Costas, M. 1990).

#### **2.1.2.2. Fenotipik Metotlarda Kullanılan İdentifikasyon Anahtarları ve Teşhis Tabloları**

Fenotipik karakterizasyonun amaçlarından birisi organizmaların doğru bir şekilde identifikasyonu için temel bir yapı oluşturmaktır. Bu yapı sırayla yapılmış testlerin sonucunda aynı çıkan izolatların eşleştiği bir identifikasyon anahtarından oluşabilir. Bunun yanı sıra mikrobiyolojide teşhis tabloları daha yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu tablolar identifikasyon anahtarlarından daha fazla bilgi içermektedir ve tespit amacıyla daha kullanışlıdır (Trüper, H.G. and Schleifer, K.H. 1992). Bu tablolar, çalışılmış taksonların çeşitli özelliklerinin kaydedildiği ve tür içi çeşitliliğin gösterilmesi için gerekli özellikleri içeren tablolarıdır (Sneath, P.H.A. 1977).

### **2.1.2.3. Fenotipik Metotlarda Kullanılan Mikrobiyal İdentifikasyon Sistemleri**

Endüstrinin özellikle klinik mikrobiyolojiye olan en önemli katkısı klasik metotları temel alarak minyatürize identifikasyon sistemleri geliştirmesi olmuştur. Ticari olarak elde edilebilen bu sistemler (API, Analytab Products, Plainview, NY, USA; Biolog, Biolog Inc., Hayward, CA, USA; Vitek, Vitek Systems, Inc. Hazelwood, MO, USA) çoğunlukla klasik metotların modifiye edilmiş şekilleridir (D'Amato, E.E. et al. 1991).

### **2.1.2.4. Genomik Metotlar**

Kemotaksonomide kullanılan hücre yapıtaşlarının aksine RNA ve kromozomal DNA'nın yapısı gelişme ortamlarına bağlı olarak değişim göstermez. Nükleik asitlerdeki bilgilerin en önemli kaynağı bakteriyel genomun tamamında bulunan nükleotit sekanslarıdır. Zaten tüm sınıflandırma metotlarının ortak amacı bu nükleotit sekanslarının anlamlarını ortaya çıkarmaktır (Logan, N.A. 1994).

Genomik metotlar kullanılarak oldukça güvenilir ve sağlam bir sınıflandırma yapılabilmektedir. Bu prokaryot genomlarının, taşınabilir elementleri sabit olarak taşınmalarının bir sonucudur. Genomik metotlar kullanılarak hangi türe ait olduğu konusunda karışıklıklar olan birçok suşun problemi çözülmüş, DNA-DNA benzerlik çalışmaları sonucu yeni türler ortaya çıkarılmış ve tür seviyesinde birçok taksonomik problem çözülmüştür (Staley, J.T. ve Krieg N.R. 1984).

Genomik bilginin eldesi için uygulanan bu metotlar doğrudan DNA veya RNA moleküllerine bağlı olarak uygulanmaktadır. Günümüzde modern taksonomik çalışmalarda genomik metotların çok etkili olması, sadece teknolojik gelişmelerin sonucu olmayıp DNA'daki kodların genotipik özelliklerde ortaya çıkmasıyla oluşan etkidendir (Vandamme, P. 1996).

Daha fazla bakteri türünün gruplandırılabilir olması, sık ve radikal değişikliklere sebebiyet vermemesi, sınıflandırma sonrasında organizmaların daha güvenilir tanımlanabilmesi, çeşitli bakteriyel grupların nasıl evrimleştiği ve onların atasal ilişkileri hakkındaki bilgilerin elde edilebilir olması sebebiyle genetik ilişkilere dayalı olarak yapılan sınıflandırmanın bazı avantajları vardır (Staley, J.T. ve Krieg N.R. 1984). Nükleik asit çalışmalarının dezavantajları ise çalışılacak materyalin çok küçük oluşu, yoğun bir hazırlık aşaması gerektirmesi ve saflaştırma işlemlerine gerek duyulmasıdır. Miktar sorununu çözmek amacıyla günümüzde bazı cihazlar geliştirilmiş olup, PCR (Polymerase chain reaction) kullanılarak genomun istenilen bölgeleri çoğaltılabilmektedir. PCR, elde edilen DNA sekanslarının in vitro olarak replikasyonunu sağlayarak bakteriyel sınıflandırma ve identifikasyonunda önemli bir yere sahiptir (Logan, N.A. 1994).

Mikrobiyoloji laboratuvarlarına PCR metotlarının girmesiyle çok geniş bir uygulama alanı açılmış (Vandamme, P. 1996), bu sayede diğer metotların yanı sıra farklı tiplendirme metotları da geliştirilmiştir (Williams, J.G.K. et al. 1990). Bakterilerin tiplendirilmesi için birçok PCR uygulaması olmakla birlikte bunlar sadece tür içi çeşitliliğin anlaşılması için uygundur. Bu nedenle bu metotlar yüksek taksonomik ünitelerin oluşturulması için uygun olmayıp, prokaryotik sınıflandırmada kullanılmaları oldukça sınırlanmıştır.

En mükemmel genomik bilgi hiç şüphesiz bakteri genomunun bütününde bulunmaktadır. Bütün genomun sekans analizi günümüzde mümkün görünmemekle birlikte birkaç alternatif uygulama yapılmaktadır. Bu uygulamalar içinde % G+C oranı, DNA-DNA eşleştirme çalışmalarıyla genomik yapının benzerliklerinin karşılaştırılması, restriksiyon endonükleazlarla DNA fragmentlerinin meydana getirilmesi (low-frequency restriction fragment analysis (LFRFA), Restriction fragment length polymorphism (RFLP), Pulsed field gel elektroforezi (PFGE), seçilmiş genlerin sekans karşılaştırması, DNA-rRNA hibridizasyonu ve rRNA sekans analizleri sayılabilir (Rossello-Mora, R. ve Amann, R. 2001 ).

#### 2.1.2.4.1. % G+C Oranı

$(G+C / A+T+G+C) \times 100$  şeklinde hesaplanan %G+C oranı prokaryot sistematğinde kullanılan ilk nükleik asit tekniğidir (Lee, K.Y. et al. 1956). Kullanışlı olması sebebiyle fenotipik olarak benzer ancak genomik olarak farklı suşların ayırtedilmesinde rutin olarak kullanılmıştır (Goodfellow, M. and O'Donnell, A.G. 1993).

Prokaryotlar arasında G+C içeriği %20-80 arasında değişim göstermektedir (Tamaoka, J. 1994). Yapılan deneylere göre %10'dan daha fazla farklılıklarda organizmaların aynı cinse ait olmadığı ve türler arasındaki farkın genellikle %5 civarında değişebildiği görülmüştür. Daha tam olarak belirlenmemiş olsa da %15'in üzerindeki farklılıklar cins içinde heterojenitenin güçlü bir göstergesi olarak kabul edilmektedir (Goodfellow, M. et al. 1997). Bununla birlikte laboratuvar bulguları bu teoriyi her zaman desteklememektedir. Treponema gibi bazı gruplarda diğer genomik metotlarla da doğrulanarak %G+C oranı farkı %20'ye yakın bulunmuştur. % G+C oranının değişmesine sebep olan faktörler günümüzde hala anlaşılmış olmamakla birlikte bu faktörlerinde hangi oranlarda değişikliklere sebep oldukları bilinmemektedir. Ayrıca DNA örneklerinin tam olarak moleküler homojenite göstermesinin mümkün olmamasından dolayı %G+C içeriği her zaman önemli bir değer olup elde edilen sonuçlar farklılık gösterebilir (Logan, N.A. 1994).

Bunun yanısıra elde edilen %G+C oranı farklılıkları taksonomik gruplandırmaların yapılmasında faydalı olup, baz kompozisyonlarının benzerliklerinin gösterilmesine DNA'nın linear yapısında bulunan bazların miktarlarının tespit edilmediği için gerek yoktur. Bu kriterler ancak farklılıkların gösterilmesinde kullanılabilir. Görüldüğü gibi %G+C oranı diğer taksonomik karakterler gibi kullanılamaz. Taksonların homojen olduğunu göstermek için çok önemli olmakla birlikte grupların açıklanmasında dolaylı olarak kullanılmaktadırlar (Logan, N.A. 1994).

#### 2.1.2.4.2. Hibridizasyon

DNA'nın karakteristik özelliği hibridleşebilme ve yeniden oluşturulabilmesidir. Hibridizasyon, DNA çift zincirlerinin önce denatüre edilip oluşan tek zincir yapılarının uygun laboratuvar ortamlarında tekrar birleştirilmesiyle gerçekleştirilir. Bu işlem sonucunda hibrid (heterolog) formlar oluşur. Genetik yapı olarak çok yakın ilişkili iki organizmanın genellikle daha fazla sayıda nükleotit baz sekansı oluşacağı için daha yüksek oranda hibrid formasyonu (hibridizasyon) meydana gelir. Heterolog çift zincir yapısındaki yanlış eşleşmelerin miktarı, homolog çift zincir yapısının Tm noktasıyla karşılaştırılarak tespit edilebilir. Eğer bu fark çok küçük ise hibritte çok az yanlış eşleşme var demektir (Logan, N.A. 1994). DNA'ların karışımından ve tek DNA molekülünden elde edilen sonuçların karşılaştırılmasıyla benzerliğin derecesi elde edilir. Hibridizasyon işlemi sonunda iki farklı DNA'nın karışımıyla oluşan çift zincir yapısının miktarı her iki DNA arasındaki benzerliğin derecesine bağlıdır. Benzerliğin az olduğu durumlarda ise oluşan çift zincir miktarı daha az olmaktadır (Rossello-Mora, R. ve Amann, R. 2001).

#### 2.1.2.4.3. Tm noktası (Melting temperature)

DNA çift zincirinin %50'sinin birbirinden ayrılmasını (denaturasyon) sağlayan sıcaklığa "melting temperature"(Tm noktası) adı verilir. Tm noktası DNA'lar arasındaki farklılıkların tespiti için bakteri sınıflandırılmasında kullanılan önemli parametrelerdendir (Johnson, J.L. 1989).

Heterojen yapıdaki DNA'ların baz çifti sayısı homojen DNA'lardan daha az olduğu için hidrojen bağ sayısında azdır. Bu nedenle zincir daha zayıf olup, denatürasyon için gerekli Tm noktasına daha düşük ısıda ulaşılır. İşte DNA-DNA farklılıklarının tespitinde homojen DNA'ların Tm noktası ile heterojen DNA'ların Tm noktaları arasındaki farklılık buna bağlı olarak kullanılmaktadır (Rossello-Mora, R. ve Amann, R. 2001).



$\Delta T_m$  ( $T_m$  noktalar arasındaki fark), DNA çift zincir yapısının ısıya karşı dayanıklılığının bir göstergesidir (Rossello-Mora, R. ve Amann, R. 2001).  $\Delta T_m$  farkının tespiti, hem hibridizasyona gerek duyulmaması hem de verilerin dönüştürülme zorunluluğu olmamasından dolayı avantajlıdır (Grimont, P.A.D. et al. 1980). İyi tanımlanmış prokaryotik türlerle yapılan birçok çalışma sonucuna göre türlerin gruplandırılması için göz önüne alınması gereken sınırlar yaklaşık olarak %70 benzer bağ oranı ve 5°C veya daha düşük  $\Delta T_m$  değerleridir (Wayne, L.G. et al. 1987).

#### 2.1.2.4.4. rRNA analizleri

Ribozomların protein sentezindeki önemli rollerinden dolayı rRNA genlerinin iyi derecede korunduğu tespit edilmiştir ve rRNA molekülleri çevresel etkilerden değişmeyerek evrimleşmeyen genel, sabit ve yüksek derecede zor fonksiyonları olan moleküllerdir (Schlegel, H.G. and Köhler, W. 1999). Genomun yaklaşık %0.3-0.4 kadar küçük bir kısmını ifade etsede asıl önemli olmalarını sağlayan neden, kromozomların en yavaş evrimleşen yüksek korunumlu kısımları olan sistronları kodlamalarıdır. rRNA molekülünün bu özelliği, çok değişik oran ve sayıda sekans değişikliklerine ve bu sekansların bağımsız olarak yer değiştirmelerinin tespitinde kullanılmaktadır. Buna göre yakın ilişkili organizmaların sekans evrimlerinin daha uzak ilişkili organizmalara göre daha hızlı bir şekilde olduğu görülmüş, rRNA'larda yüksek korunumlu bir moleküler kilit gibi karşılaştırma işlemlerinde kullanılmıştır (Logan, N.A. 1994). Bu nedenle ve içerdikleri genetik bilgilerden dolayı, prokaryotların filogenetik gelişiminin moleküler temeli olarak seçilmişlerdir (Schlegel, H.G. and Köhler, W. 1999). Prokaryot hücrelerinin rRNA'ları ultrasantrifüj esnasında oluşturdukları sedimentasyona bağlı olarak 23S, 16S ve 5S olmak üzere üçe ayrılmıştır. Bu rRNA çeşitleri yaklaşık olarak 3300, 1650 ve 120 nükleotit uzunluğundadırlar. rRNA molekülünün tamamının sekans analizi rutin çalışmalarda uygun görülmemektedir. Bunun yerine sekans verileri dolaylı olarak DNA-rRNA hibridizasyonu veya oligonükleotit kataloğundan sekanslar seçilerek kısmen analiz edilmiştir (De Ley J. and De Smedt J. 1975; Stackebrandt, E. et al. 1985). Günümüzde 16S rRNA

uygulamaları mikrobiyal taksonomide çok yaygın olarak kullanılan standart tekniklerden birisidir. 16S rRNA moleküllerinin en önemli özelliklerinden birisi de filogenetik tahminler için çok genel kullanılan standart parametreler olması ve bunun sekans dizilişinden kolayca bulunabilmesidir (Embley, T.M. and Stackebrandt, E. 1997). Bu diziliş sekansa bağlı filogenetik ilişkilerin tespiti için ilk önemli aşamadır.

#### **2.1.2.4.5. DNA-rRNA hibridizasyonu**

RNA'nın sentezi için DNA'nın sadece tek zinciri kullanılır ve RNA moleküllerinin tek zincirden oluşmasından dolayı zincirler kendi aralarında eşleşemezler. Bu nedenle rRNA'ların, DNA'nın tamamlayıcı zinciriyle hibridizasyonu sağlanır. Bu hibridizasyon tekniği sistematikte günümüzde en yaygın olarak kullanılan tekniklerdendir. Ancak RNA'nın renatürasyonu problemlili olduğu için bu yolla hibridizasyonda elde edilen sonucu hesaplamak zordur. Ayrıca rRNA fragmentlerinin alkali ile ayrılmasını sağlayarak doğrudan hibridizasyona uğratarak farklı genom uzunluklarının ve operon sayılarının toplanması ile ürünün hesaplanması mümkündür. Diğer uygulamalar ise çeşitli kimyasal solüsyonlar kullanılarak yapılanlar olup, saf çözümlerin kullanımını gerektirmektedir (Logan, N.A. 1994).

#### **2.1.2.4.6. Oligonükleotit kataloglarının kullanılması**

Doğrudan sekans metodlarının gelişmesinde, öncelikle tüm genom yanı sıra 16S rRNA'nın kısa uzunluktaki sekanslarından (oligonükleotitler) elde edilen büyük miktardaki taksonomik bilgiler etkili olmuştur. 20 baz veya daha fazla baz sayısından oluşan ve 3' ucu guanin ile sonlanan 600 kadar oligonükleotitin T1 nükleaz ile muamelesidir. Bunların 5' ucu in vitro şartlarda <sup>32</sup>P ile etiketlenmekte ve elektroforez ve ince tabaka kromatografisi (TLC) ile ayrıştırılmaktadır. Oligonükleotitlerin uzunlukları ve yapıları iki boyutlu ince tabaka kromatografiden alınarak alkali ile eritilip ince tabakada yürütülmeleri sonucundaki pozisyonlarına göre tespit edilmektedir. Sekanslar her suş için tablolar halinde toplanmış ve bir katalog

oluşturulmuştur. Bu metot gerekli laboratuvar cihazları olmasına rağmen 4-5 hafta gibi uzun bir süre alan ve pahalı maliyeti olan bir metottur (Logan, N.A. 1994).

#### 2.1.2.4.7. Restriction endonükleaz analizleri

Restriction fragment length polymorphism analysis (RFLPA) veya genetik fingerprinting olarak adlandırılan bu teknik çok az miktarda DNA gerektiren basit ve çabuk sonuç veren bir metottur. Filogenetik çalışmalardan epidemiyolojik çalışmalara kadar geniş bir alandaki taksonomik çalışmalar için önemli bir metottur. DNA çeşitli restriksiyon endonükleazlarla farklı spesifik bölgeler içeren fragmentlere parçalanır. Bu fragmentlerin sayısı ve yeri her genom için farklı olup, bu farklı büyüklükteki fragment gruplarının eşleşmeleri de her biri için farklı olmaktadır. Bu, 50 veya daha fazla sayıda fragmentlerle sınıflandırma organizmalara bağlı olarak spesifik restriksiyon endonükleazlarla yapılır. Farklı endonükleazlar, taksonomik olarak değişiklik gösterebilecek gruplarla farklı eşleşmeler ortaya çıkarırlar (Logan, N.A. 1994).

16S rRNA filogenetik çalışmalarında da PCR ile amplifikasyon sonrasında fingerprinting kullanılabilir. Primer hedef bölgenin seçimi zor olmayıp, rRNA'ların kullanılabilir bölgeleri ve korunmaları hakkında çok faydalı bilgiler sağlanabilmektedir (Logan, N.A. 1994).

## 2.2. Pseudomonas Genusu ve Özellikleri

### 2.2.1. Pseudomonasların Sınıflandırılmasının Tarihi Gelişimi

Tip türü *Pseudomonas aeruginosa* (Schroeter 1872) Migula 1900'dır (Palleroni, N.J. 1984). *Pseudomonas* genusu ilk olarak Migula tarafından 1894 yılında basit bir şekilde açıklanmış ve birçok takson bu genus içinde toplanmıştır. *Pseudomonas* türleri "Index Bergeyana" (Buchanan, R.E., et al. 1966)'da, bu indeksin ekinde (Gibbons, N.E., et al. 1981) ve daha sonra yayımlanan uluslararası bilimsel dergilerde 800'den fazla sayıda isimle listelenmiştir.

Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (Krieg, N.R. et al. 1984)'nin ilk baskısı ve bunu takiben yayımlanan Bergey's Manual of Determinative Bacteriology'de bu genus içerdiği fenotipik çeşitliliğe bağlı olarak detaylı bir şekilde açıklanmıştır. Son 25 yılda uygulanan DNA-rRNA hibridizasyon (De Ley J. and De Smedt J. 1975; Johnson, J.L. 1985), 16S rRNA oligonükleotit katalog (Fowler, V.J., et al. 1985), 5S (De Wachter, R., et al. 1985; Lane, D.A., et al. 1985), 16S veya 23S rRNA karşılaştırmalı sekans analizleri (Embley, T.M. et al. 1988; Edwards, U. et al. 1989) gibi rRNA'ya dayalı genotipik tekniklerin gelişimi ile daha önceden bilinen bakteriyel ilişkilerde değişiklikler olmuştur. Bu yeni tekniklerin uygulanmasının en önemli sonuçlarından biriside, *Pseudomonas* genusunun yeniden sınıflandırılması olmuştur. Bu çalışmalara dayalı olarak *Pseudomonas* genusunun (Palleroni, N.J. 1984) en az 4 büyük genotipik grup içerdiği gösterilmiştir (Palleroni N.J. et al. 1973; De Vos, P. and De Ley, J. 1983; Woese, C.R. et al. 1984). Bununla birlikte bu gruplarında kendi içlerinde fenotipik çeşitlilik göstermelerinden dolayı tam bir ayrıma gidilememiştir. Ayrıca fenotipik özelliklere bağlı olarak cins düzeyinde meydana gelen karışıklık tür düzeyinde identifikasyonuda oldukça zorlaştırmıştır. Bu yapının anlaşılabilir hale gelmesi için genus ilk olarak daha küçük gruplara ayrılmış ve kesin özelliklerine göre tekrar düzenlenmiştir. *Pseudomonas*ların günümüzdeki taksonomik yapıya göre gruplandırılışı, Tablo 1'de verilmiştir.

Palleroni tarafından 1984 yılında yapılan en son sınıflandırmada, bilinmeyen *Pseudomonas* suşları ayrı bir genotipik gruba dahil edilerek identifikasyon kolaylaştırılmış, böylece diğer gruplardaki tür sayısı önemli oranda düşürülmüştür. Günümüzde genotipik karakterizasyonla çok sayıda suş sınıflandırılmış olsa da poliaminler (Busse, J. and Auling, G. 1988), yağ asitleri ve quinonlar (Oyaizu, H. and Komagata, K. 1983) gibi çok faydalı indikatörler olabilecek kemotaksonomik materyallerin çalışılmasıyla daha fazla suş sınıflandırılacaktır. Tür düzeyinde kesin identifikasyon için genellikle bulunan fenotipik özelliklerin protein jel elektroforezi, DNA-DNA hibridizasyonu veya RFLP analizleri gibi yüksek oranda doğru sonuç veren tekniklerle birlikte yapılması tercih edilir. Bu işlem tür düzeyinde bir identifikasyon için zorunluluk olmamasına karşın, DNA-rRNA hibridizasyon

çalışmalarıyla gruplara ayrılmış olan *Pseudomonas* genusunun genotipik gruplarına ilave bilgiler sağlayacaktır (Willems, A. et al. 1992).

Tablo 1. *Pseudomonas*ların günümüzdeki taksonomik yapıya göre gruplandırılışı (Collier, L. et al. 1998).

<b>Pseudomonas</b> generusu
(rRNA homoloji grup 1)
Fluorescens türler: <i>P. aeruginosa</i> , <i>P. putida</i> , <i>P. fluorescens</i> , <i>P. chloraphis</i> , <i>P. cichorii</i> , <i>P. syringae</i> , <i>P. viridiflava</i> , <i>P. flavescens</i>
Non-fluorescens türler: <i>P. alcaligenes</i> , <i>P. pseudoalcaligenes</i> , <i>P. stutzeri</i> , <i>P. mendocina</i>
Diğer generuslar
rRNA grup II: <i>Burkholderia</i>
rRNA grup III: <i>Comomonas</i> , <i>Hydrogenophaga</i> , <i>Acidovorax</i>
rRNA grup IV: <i>Brevundimonas</i>
rRNA grup V: <i>Stenotrophomonas</i> , <i>Xanthomonas</i>
<i>Sphingomonas</i> (Hiçbir rRNA grubuna dahil edilememiştir.)

### 2.2.2. Habitatları

*Pseudomonas*lar toprak, çürümekte olan organik maddeler, vejetasyon ve suda daimi olarak bulunan organizmalardır. Bu ortamlar dışında sulak alanlarda yetiştirilen zirai ürünlerde, lağım çukurlarında, tuvaletlerde, hastane ortamı ve hastanelerde kullanılan temizlik maddelerinde, solunum ve dializ cihazlarında ve hatta dezenfeksiyon solüsyonlarında bile bulunurlar (Brooks, G.F. et al. 1994).

Çok sayıda doğal materyal *pseudomonas*ların izolasyonu için iyi bir kaynak oluşturmaktadır. Birçok ortamda *pseudomonas*lar toplam mikrobiyal floranın küçük bir kısmını oluşturuyor gibi görülmekte sınırlı ortamlarda (pH nötre yakın, organik materyal içeren, mezofilik ısı sınırlarında ve çözünmüş oksijence zengin) kompleks gelişim istekleri olmadığı için hızlı bir gelişim gösterirler (Favero, M.S. et al. 1971).

1962 yılında Leifson nehir suyundan *P.spinosa* , distile sudan da *P.huttiensis* ve *P.lanceolata* türlerini izole etmiştir (Leifson, E. 1962). Daha sonra 1972 yılında Baumann ve ark. yaşamları için sodyuma (Na) ihtiyaç duyan *P.marina*, *P. nautica* ve *P.doudoroffii* türlerini deniz sularından izole etmişlerdir (Baumann, L. et al. 1972).

Saprofitik fluoresans pseudomonaslar bolca buldukları bitki rizosferleri dışında topraktada çok yaygın olarak bulunmaktadır. Bu pseudomonaslar bitkinin gelişimine de faydalı etkiler yapmaktadırlar. Buğday rizosferindeki baskın fluoresans pseudomonas türü *P.fluorescens* biovar G'dir (Sands, D.C. and Rovira, A.D. 1971). *P.rhodos* türünün izolasyon kaynağı kızılâğaç rizosferidir (Heumann, W. 1962). Leylak yapraklarından birçok pseudomonas türü izole edilmiş olup en sık izole edilen tür *P.fluorescens* ve daha az sıklıkta *P.maltophilia* (*S.maltophilia*) ve *P.cepacia* türüdür. Ayrıca bu yapraklardan daha sonra yeni bir tür olarak tespit edilecek olan pembe renkli koloniler üreten *P.mesophilica* (*Methylobacterium mesophilum*) izole edilmiştir (Austin, B. and Goodfellow, M. 1979).

Bitki patojeni olan Pseudomonas türleri doğal zenginleştirme ortamları olan bitki lezyonlarından izole edilmişlerdir. Çünkü bu ortamlar onların ekolojik nişlerini oluşturmakla birlikte spesifik çalışmalarda çok değişik materyallere ihtiyaç duymaktadırlar (Palleroni, N.J. and Dodoroff, M. 1972)

*Pseudomonas*ların çevrede geniş bir yayılım göstermeleri çok basit gelişim ihtiyaçlarına sahip olmalarındandır. Minimal besin ihtiyaçlarını 4-42°C gibi geniş bir sıcaklık aralığında tolere edebilirler ve birçok antibiyotiğe ve dezenfektanlara karşı dirençlidirler. *Pseudomonas*lar epidemiyolojik olarak kontamine alanlarda görülmedikçe enfeksiyonlar için sadece bir kaynak iken kontamine alanlarda patojen özellik kazanabilmektedir. Bu nedenle klinik kaynaklı ve fırsatçı olan bu mikroorganizmaların sıkı bir şekilde kontrolü gerekmektedir (Brooks, G.F. et al. 1998).

Pseudomonaslar klinik laboratuvarlarda ve tıbbi uygulamalarda kullanılan çok farklı materyallerden izole edilmişlerdir. Bu materyaller arasında su, hatta distile su (Favero, M.S., et al. 1971, Carson, L.A., et al. 1973, Roberts, L.A., et al 1990), tuz solusyonu (Phillips, I. et al. 1971), boya solusyonu (Walsh, D.M. and Eberiel, D.T. 1986), antiseptik solusyonlar (Mitchell, R.D. and Hayward, A.C. 1966), ilaçlar, kozmetik ürünler, bitki materyal preparasyonları, medikal araç ve gereçlerde sayılabilir. Ayrıca Pseudomonaslar insan veya hayvan vücudunun çeşitli bölgelerinde türe bağlı olarak yayılış gösterirler. Genellikle hayvanlar pseudomonaslar için iyi bir kaynak olmamakla birlikte *P.mallei* dışındaki türleri fırsatçı patojen olabilirler. Görüldüğü gibi Pseudomonaslarla kontaminasyonu önlemek pratik olarak imkansız olup, immun sistem enfeksiyonlarında (yanıklarda ve doğum servislerinde, AIDS ve kanser gibi) kaygı verici bir hal almaktadır (Collier, L. et al. 1998).

### 2.2.3. Morfoloji ve Hücre Yapısı

0.5-1.0  $\mu\text{m}$  çapında, 1.5-5.0  $\mu\text{m}$  uzunluğunda düz veya hafif eğimli basillerdir. Pseudomonas suşlarının hücreleri nadiren büyüklük ve şekil olarak normalden çok farklı olabilir. Bazı türlerin hücreleri oval şekilli olabilirken bazı bitki patojenlerinin hücreleride 4  $\mu\text{m}$ 'den uzundur. Bazı türlerin mezozom (Carric, L. and Berk, R.S. 1971; Hoffman, H.P. et al. 1973) gibi membran yapıları elektron mikroskopuyla ayrılabilir (Palleroni, N.J. 1984).

Çoğu türü nitrojence fakir ortamlarda geliştirildiklerinde büyük miktarda poly- $\beta$ -hydroxybutyrate (PHB) granülleri üretirken bazı türlerde (*P. pseudoalcaligenes* gibi) bu miktar oldukça düşük olup tespit etmek için spesifik enzimlerle ekstraksiyon ve hidroliz gerekebilir. Diğer bazı poly- $\beta$ -hydroxyalkanoate (PHA)'lar fluorescens pseudomonaslar tarafından sentezlenmektedir (Huijberts, G.N.M. et al. 1992; Hori, K. et al. 1994).

Hareketli olması genusun karakteristik özelliğidir ve bu her hücrede bulunan bir veya birden fazla polar flagellaya bağlıdır. Hareketliliğini aerobik metabolizmadan elde ettiği enerjiyi dönüştürmesinden sağlar (Sherris, J.C. et al.

1957). Nadiren hareketsiz olanlarda görülür. *Pseudomonas* hücreleri tipik olarak polar (kutupsal) flagella taşımakla birlikte bazı türleri subpolar flagellalı olabilirler. Subpolar flagellalı olan türleri peritrik flagellalı diğer genulardan ayırmak oldukça zordur. Buna ilaveten kısa boylu lateral flagella üreten bazı türler (*P.stutzeri*, *P.mendocina*) olup bu türleri ayırmak daha kolaydır (Collier, L., et al. 1998).

Birçok türde fimbria veya piluslar bulunur. Bunlar hareketli veya hareketsiz olarak yüzeyde toplanıp ayrıca bakteriofaj parçalarının yakalanarak tutulmasını sağlarlar. Ayrıca bunlar katı besiyeri yüzeyinde hareketliliğe sebep olabilirler. *P.aeruginosa*'daki pilusların organizmanın DNA'sında bulunan düşük G+C oranı ile bağlantılı olabileceği ayrıca *Neisseria* ve *Moraxella* gibi uzak ilişkili organizmaların piluslarıyla sekans homolojisi gösterdiği ve türler arası genlerin karşılaştırıldığında farklılıklar gösterdiği bulunmuştur. Bu nedenlerden dolayı pilus markerlarının günümüzde taksonomik bir özellik kullanımı sınırlıdır (Collier, L., et al. 1998).

#### 2.2.4. Pigmentasyon

Pigmentasyon, bakteriler tarafından renkli koloni üretimi veya besiyeri yüzeyine pigment salgılanması olup bakteri türlerinin tespitinde kullanılan önemli bir özelliktir. Bakteriyel pigmentler sekonder metabolitlerden olup, optimum şartları çok değişken olmakla birlikte, gelişme ısısı, ortamı ve besiyeri içeriklerine bağlı olarak farklı renklerde oluşturulurlar (Collier, L., et al. 1998). Bakteriyolojide kemotaksonomik uygulamalardan biri de pigment spektrumlarından yararlanarak bakteriler arası ilişkiyi ortaya koymaktır. Sekonder metabolitlerden olan bakteriyel pigmentlerin yapısı da genetik faktörlerle kontrol edilmektedir. Çeşitli çözümler yardımıyla elde edilen pigmentlerin spektrumlarındaki maksimal absorpsiyon piklerinin sayısı ve pozisyonu her bir pigment için karakteristiktir (Karrer, P. and Jucker, E. 1950). *Pseudomonas* genusunun daha önceki çalışmalarında, pigmentasyon genetik bir karakter olarak görülmekle birlikte günümüzde bu genusun pigmentsiz türlerde içerdiği ortaya çıkarılmıştır. Koloniler ve diğer hücre yapıları normal renkleri yanı sıra bazı durumlarda içeriklerine bağlı olarak farklı renklerde görünebilirler. Örneğin pigmentsiz türlerde gruplandırılmış olan *P.stutzeri*'nin bazı



susları yüksek konsantrasyonda sitokrom c içermeleri sonucu kırmızımsı kahverengi koloniler halinde görülebilirler (Palleroni, N.J. 1984).

#### 2.2.4.1. Floresans veren pigmentler

Floresans pigmentler *P.aeruginosa*, *P.putida*, *P.fluorescens*, *P.chlororaphis*, *P.syringae*, *P.cichorii*, *P.flavescens* gibi floresans pigment oluşturan pseudomonasların düşük demir içerikli besiyerlerinde bol miktarda ürettikleri, karakteristik özelliklerini veren pigmentlerdir. Bu pigmentler sideroforlar olup günümüze kadar kimyasal yapıları hakkında pek fazla bilgi elde edilememiştir (Wendenbaum, S., et al. 1983; Demange, P. et al. 1986; Meyer, J.M. et al 1990).

Bu pigmentlerin üretimini artıran besiyeri King, Ward ve Raney (1954) tarafından açıklanmış ve "King B" olarak isimlendirilmiştir. Floresans pigmentler bu besiyerine serbest olarak yayılmakta ve spektrofotometrik ölçümlerde 270 ve 400 nm'de absorbanans vermektedirler (Collier, L., et al. 1998).

#### 2.2.4.2. Fenazin pigmentler

Pseudomonasların suda çözülebilir pigmentleri arasında en çok bilinen fenazin pigmentleri pyoverdin ve pyocyanin'dir (King, E.O., et al. 1954). Bu pigmentler uzun yıllar bakteriyologların çalışma konusu olmuştur. Pyocyaninin yapısı tam olarak açığa çıkarılmış ancak pyoverdinin yapısı kısmen açıklanabilmiştir. Pyoverdinler değişik bir yapıda olup, düşük moleküler ağırlıklı ürünlere ayrışabilen çeşitli bileşiklerden oluştukları yapılan çalışmalarla açıklanmıştır. Temel yapıları türlere bağlı olarak değişmekle birlikte siklik peptit yapısına bağlı quinolin kromofordur. *P.aeruginosa*'nın pyocyanini, fenazin pigmentleri arasında en iyi bilinen pigment grubudur. Pyocyanin mavi renkli olup florescens pigmentler gibi besiyerine yayılma gösterir (Palleroni, N.J. 1984).

Diğer fenazin pigmentleri, *P.chlororaphis* için karakteristik daha az eriyebilir özellikte ve koloniler etrafında kristalize olan yeşil bir pigment

“chlororaphin” ve yine aynı tür tarafından üretilen turuncu renkli “fenazin- $\alpha$ -karboksilat”tır. *P. aeruginosa*'nın bazı suşlarının da bu grup pigmentleri ürettiği açıklanmıştır (Palleroni, N.J. and Doudoroff, M. 1972).

#### 2.2.4.3. Lemonnierin

Lemonnierin, *P. fluorescens* biovar IV suşlarından *P. lemonnieri* suşu için karakterize olan hücre içi ve çözünmeyen bir pigment olup, yapısı Ferguson et al. 1980 ve Jain ve Whalley 1980 tarafından ortaya çıkarılan 3,3-bipiridil türevidir (Ferguson, G. et al. 1980; Jain, K.C. and Whalley, W.B. 1980).

#### 2.2.4.4. Karotenoidler

Karotenoidler, genellikle sarı veya turuncu renkli, suda çözünmeyen ve hücre sel yapılarıyla bağlantılı olarak pigment üreten *P. alcaligenes*, *P. mendocina*, *P. vesicularis*, *P. flava*, *P. pseudoflava*, *P. palleronii*, *P. rhodos*, *P. echinoides*, *P. radiora* gibi birçok tür tarafından üretilen pigmentlerdir. Ayrıca *Sphingomonas paucimobilis* türü tarafından nostoksantin olarak isimlendirilen karotenoidler üretilmektedir (Fuller, A.T., et al. 1971) Ayrıca bu pigmentlerin kimyasal yapılarının tam olarak açıklanamadığı için bazı pigmentler yanlışlıkla karotenoid pigment olarak isimlendirilmektedir (Collier, L., et al. 1998).

#### 2.2.4.5. Diğer pigmentler

Bu pigmentler *P. aeruginosa*'nın bazı suşları tarafından üretilen ve daha önce açıklanan pigmentleri dışındaki pigmentlerdir. Örneğin bunların içinde bulunan pyorubin, aeruginosin A (Holliman 1957) ve aeruginosin B (Herbert ve Holliman 1964) pigmentlerinin karışımıdır. Bu türün bazı suşları siyah renkte pyomelanin üretirler (Yabuuchi, E. and Ohya, A. 1972). En son olarak *Xanthomonas* (Hildebrand et al, 1994) türlerinin karakteristik pigmenti olan xanthomonadin'den farklı olarak *P. flavescens* tarafından sarı bir pigment üretildiği bulunmuş fakat kimyasal karakterizasyonu henüz yapılmamıştır (Collier, L., et al. 1998).

### 2.2.5. Gelişme Ortamları ve Fizyolojik Özellikleri

Çoğu *Pseudomonas* türü amonyum iyonları veya nitrat ile enerji veya karbon kaynağı olarak tek bir organik bileşen içeren çok basit mineral besiyerlerinde gelişir (Palleroni, N.J. 1984). Buyyon kültüründe yüzeyde zar oluşturarak, bol ve homojen bir üreme gösterirler. *Vibrio* türlerinin de üretildiği alkali besiyerlerinde ya da enterik bakterilerin izolasyonunda kullanılan SS, XLD (Xylose Lysine Deoxycholate agar), hektoen agar, brilliant green agar besiyerlerinde ürerler ancak izolasyon oranı kanlı jeloza göre daha azdır. Jeloz besiyerinde geniş, yaygın ve kenarları düzensiz koloniler oluşturur. Virülans faktörü hemolizineri olan *P.aeruginosa* kökenleri kanlı besiyerlerinde hemoliz oluşturur. Glikoz ve bazı karbohidratları oksidasyon yolu ile parçalayıp asit oluştururlar. Laktoz ve sukroza etki etmezler. İndol ve H<sub>2</sub>S yapmazlar. Metil kırmızısı ve Voges proskauer testleri olumsuzdur. Kemoorganotrofik türleri, fakültatif kemolitrof olup enerji kaynağı olarak hidrojen ve karbonmonoksiti kullanabilirler. Aerobik olup bazı türleri nitratı kullanarak anaerobik olarak gelişebilir. Üreyi amonyak haline ya da amonyağı üreye çevirebilirler ve bunları azot kaynağı olarak kullanabilirler (Vasil ML, 1981; Palleroni, N.J. 1984). Hepsi olmamakla birlikte çoğu asidik ortamlarda gelişemezler. Oksidaz positif veya negatif olabilirler. Katalaz pozitiftirler (Palleroni, N.J. 1984). Lizin ve ornitini dekarboksile etmezler (Töreci, K. 1981). *Stenothrophomonas maltophilia* metionin ve sistin, *Brevundimonas diminuta* ve *B.vesicularis* ise pantotenat, biotin ve siyanokobalamine gelişim için ihtiyaç duymaktadır (Collier, L., et al. 1998). *Pseudomonas* türlerinin tek karbon bileşikleri içeren basit besiyerlerinde gelişebilme yetenekleri çok yaygın bir besinsel karakterizasyon yapılması için temel oluşturmaktadır. Bu organik bileşiklerin sayı ve tiplerinin değiştirilmesi ile gelişmeyi sağlayan bileşikler tespit edilerek, sabit kimyasal içerikli besiyerlerine bunların ilavesi ile verilen türlerin tanımlanmasına önemli katkılar sağlamıştır (Palleroni, N.J. 1984).

Suşların birçoğu için en iyi gelişme sıcaklığı 28°C'dir. Ancak *P.aeruginosa* gibi mesofilik sıcaklık aralığının üst sınırına yakın (44°C) gelişim gösterebilirler. Bu türlerin suşları, genetik manipulasyonlarıyla elde ettikleri fenomenleriyle bu yüksek sıcaklık derecelerinde kolayca gelişebilmektedirler. Bu nedenle bu cinsin üyeleri termofilik olarak değerlendirilmemelidir (Palleroni, N.J. 1984).

Toprakta, daha önemlisi bazı hastane ortamlarında canlılığını koruyabilmesi nitratları kullanabilmesi ile açıklanır. Arginin'i anaerob olarak ornitine çevirmesi ve bu yol ile enerji üretmesi oluşturduğu infeksiyonların başlangıç aşamasında ona avantaj sağlar (Vasil, M.L. 1981).

Pseudomonasların bazı türleri gelişim için tercih ettikleri karbonhidratlarla adlandırılmışlardır (*P.saccharophila* gibi) fakat bu bileşikler genellikle çoğu tür için en iyi karbon ve enerji kaynağı değildirler. Çok sayıda aromatik bileşik Pseudomonas türlerinin gelişimi için kullanılabilir. Bu bileşiklerin birçoğu (benzoat, p-hidrobenzoat, mandelat, triptofan, salisilat gibi) RNA grubu tarafından metabolize edilebilir. Birçok aminoasit Pseudomonas türlerinin birçoğu tarafından karbon, nitrojen ve enerji kaynağı olarak kullanılabilir. Tek istisna ise sadece *P.aeruginosa* tarafından azot kaynağı olarak kullanılabilen methionin'dir. *P.aeruginosa*, *P.fluorescens*, *P.putida* ve *P.acidovorans*'da temel olarak permeazlar identifiye edilmiştir. *P.acidovorans*'ta L-triptofanın yüksek spesifite göstermesi gibi bazı permeazlar yüksek spesifite gösterirken bazı türlerde bunun tersi gerçekleşebilmektedir (Palleroni, N.J. 1984).

### 2.2.6. Genetik Yapısı

*P.aeruginosa* genetik açıdan en iyi bilinen aerob pseudomonas türüdür. Bu türün genetik haritası ortaya çıkarılmıştır (Holloway, B.W. and Carey, E. 1993). *P.aeruginosa*'da genetik markerlar konjugasyon, transdüksiyon ve transformasyon yoluyla taşınabilmektedirler. Konjugasyon kromozomal haritaların ortaya çıkarılması için en etkili yöntem olmakla birlikte *P.aeruginosa*'da uygulanan işlem akışı *Escherichia coli*'ninkinden farklıdır. Pseudomonaslarda yüksek sıklıkta rekombinasyon (Hfr) tipi suşlar çok nadir olup, konjugasyon mekanizmasının büyük

bir kısmı bilinmemektedir. Buna rağmen konjugasyon uygulamaları uzun yıllar plazmid DNA çalışmalarında güvenilir bir şekilde kullanılmıştır. Daha sonraları ise plazmidlerin ısıya duyarlı mutantları ve transpozonlar kullanılmaya başlanmıştır. Transpozonlar plazmidlerle kromozoma yerleştirilmiş ve bu teknik uygulanmaya başlanmıştır. Bu transpozonların eklenen plazmidlerle homoloji bölgeleri oluşturmaları sonucu genomun istenilen bölgeleri tespit edilebilmiştir. Fakat tüm türler için transpozonlar kullanılamamış, *P.putida* için farklı bir sistem geliştirilmiştir. Ayrıca bu sistem bu türün sadece bir suşunda kullanılabilmiş, diğer suşlarında kullanılamamıştır. *P.putida*'nın kromozomal haritası 1990 yılında Strom ve Morgan tarafından ortaya çıkarılmıştır. *P.aeruginosa* ve *P.putida*'nın kromozomal yapıları karşılaştırıldığında muhtemelen ortak bir atadan farklılandıkları söylenebilmektedir (Holloway, B.W., et al. 1990). Carlson ve arkadaşları ise yaptıkları çalışmada *P.stutzeri*'nin hücrel indüksiyona gerek duymadan doğal transformasyon sistemini açıklamışlardır (Carlson, C.A., et al. 1983; Carlson, C.A., et al. 1984). Pseudomonasların diğer non-fluorescens türlerinde de (rRNA grup 1) doğal transformasyon meydana geldiği görülmüştür.

Genom boyutu bazı aerob pseudomonaslar için hesaplanmıştır. *P.aeruginosa* için farklı değerler rapor edilmişse de PAO için yaklaşık olarak 5.9 megabaz çifti olduğu rapor edilmiştir (Römling, U. and Tümmler, B. 1992). Bu değer  $3.65 \times 10^6$  kDa'a karşılık gelmektedir. *P.fluorescens* için bu değer  $3.5 \times 10^6$  ile  $4.8 \times 10^6$  arasında değişmekle birlikte, *P.stutzeri* için bu değer  $4.2 \times 10^6$  olarak tahmin edilmektedir (Collier, L., et al. 1998).

DNA'larındaki % G+C oranı 58-70 arasındadır. Genellikle düşük erime noktasına sahip agaroz bloklarındaki hücrelerden litik enzimlerle ekstrakte edilen kromozomal DNA endonükleazlarla eritilerek çalışılmıştır. Grothues ve Tümmler tarafından 1991 yılında geliştirilen bu metotta 235 suş çalışılmış ve 32 Pseudomonas türü tespit edilmiş ve bu türlerde A-T zengin bölgelere veya nadiren tetranükleotit CTAG içeren bölgelere spesifik AsnI, DraI, SpeI, XbaI ve PaeI enzimleri tespit edilmiştir (Collier, L., et al. 1998).

### 2.2.7. Plazmidler

Pseudomonaslar, antibiyotiklere, metaller ve inorganik anyonlar gibi basit diğer antibakteriyel ajanlara, bakteriofajlara, bakteriosinlere veya fiziksel ajanlara dirençliliği veya özel metabolik özellikleriyle verimliliği kodlayan plazmidlerce taşınan genler bakımından oldukça zengindirler. Bu verimliliği etkileyen plazmidler, aromatik bileşikler veya onların halojen türevlerini indirgeyen enzimleri kodlayan genleri taşıyan plazmidlerdir (Collier, L., et al. 1998). Bazıları gelişme şartlarında rol alırken, bazıları çeşitli ajanlara (R plazmidleri) dirençliliğe, bazıları daha önce kullanılmamış karbon kaynaklarını kullanabilme kapasitesine etki ederler. Böylece genus üyelerinin birçoğuna çok yönlü olarak fayda sağlamış olurlar. Pseudomonas genusuna ait birçok plazmid son yıllarda açıklanmıştır. Bunların arasında en iyi bilineni bazı *P.putida* suşlarında bulunan TOL adındaki katabolik plazmid olup toluen, ksilen ve benzer aromatik bileşiklerde gelişme yeteneğini kodlamaktadır (Assinder, S.J. and Williams, P.A. 1990). Ayrıca *P.aeruginosa* plazmidlerinin yaklaşık yarısı civa iyonlarına karşı dirençliliği kodlamaktadırlar (Jacoby, G.A. and Shapiro, J.A. 1977). Pseudomonas plazmidlerinin krom, bor ve tellurium'a dirençliliği kodladığı da tespit edilmiştir (Krieg, N.R. 1988).

Toksik bileşikler sıklıkla konak hücre tarafından assimile edilirler fakat plazmidler bu assimilasyonu organik bileşikler malonat gibi daha basit yapılara parçalayarak daha da kolaylaştırırlar (Kim, Y.S. and Kim, E.J. 1994). Buradan da açıkça anlaşılacağı gibi katabolik plazmidler aerop pseudomonasların besinsel çeşitliliklerine katkıda bulunmaktadır. Enterik bakterilerin plazmidlerinde olduğu gibi, Pseudomonaslarında plazmidleri tam uygun olmayan gruplar halinde sınıflandırılabilir. 13 gruba ayrılmış olmaları yanısıra hiçbir gruba dahil edilemeyen bazı plazmidler vardır. Katabolik plazmidlerin çevresel önemi Sayler ve ark. tarafından 1990 yılında açıklanmıştır. Bu çalışmanın sonucu bu plazmidleri taşıyan suşların hepsinin yaklaşık 3 grup oluşturduğu bulunmuştur. Maalesef çalışılan çoğu *Pseudomonas sp.* suşunun tam bir identifikasyonu yapılamamış ve bunu takip eden taksonomik analizleri gerektirdiği bildirilmiştir (Palleroni, N.J. 1993a).

### 2.2.8. Antimikrobiyal Ajanlara Dirençlilik

*Pseudomonas* türlerinin çoğu antimikrobiyal ajanlara dirençlidir. Antibiyotik ve ilaç duyarlılığı çalışmaları, yeni türlerin açıklanmasını sağlayabilecek kadar önemli ve faydalı çalışmalardır (Krieg, N.R. 1988). Günümüzde *Pseudomonas*lara karşı aktif etki gösteren az sayıda penisilin kalmıştır. Bu penisilinlerinde aktiviteleri oldukça düşüktür. Örneğin, yapılan bir çalışmada *P.saccharophila* 'ya karşı Penisilin G'nin minimum inhibisyon konsantrasyon (MIC) değeri 5µg/ml bulunmuş, diğer birçok *pseudomonas* türünün dirençliliği daha yüksek bulunmuştur (Palleroni, N.J. 1980).

*Pseudomonas* enfeksiyonlarına karşı genellikle  $\beta$ -laktam antibiyotikleriyle aminoglikozitler birlikte kullanılmaktadır. Fakat bu kombinasyonlara da duyarlılık oldukça düşük olup, mukoid suşlar daha dirençli bulunmuşlardır (Sykes, R.B. and Richmond, M.H. 1970). Bu  $\beta$ -laktam antibiyotiklerden karbenisilline dirençliliğe plazmidlerle taşınan genlerle kodlanan  $\beta$ -laktamazlar neden olabilmektedir. Yapılan çalışmalarla bu plazmidlerin enterik bakterilerden transfer olabilecekleri gösterilmiştir. Plazmidlere bağlı antibiyotik dirençliliği, patojen *Pseudomonas*ların sebep olduğu enfeksiyonların tedavisi açısından ve bu plazmidlerin diğer patojen grup bakterilere transfer olabilmesi açısından önemlidir. Farklı konak hücrelerinde dirençlilik genlerinin etkisi zayıf olabilir fakat genellikle transpozonların yerleştirilmesiyle ve diğer replikon bölgelerinin translokasyonundan sonra bu etkinin arttığı görülmüştür (Bryan, L.E. 1979). Jacoby ve Mathew 1979 yılında yaptıkları çalışmada en az 8 farklı plazmid grubuna ait 24 *Pseudomonas* plazmidinde 7 farklı çeşit  $\beta$ -laktamaz bulmuşlardır. Ayrıca  $\beta$ -laktamazların, antibiyotiklerin bakterinin hedef bölgelerine ulaşmalarını zorlaştırdığı ve karbenisilline dirençli bakteri sayısını artırdığı ortaya çıkarılmıştır (Zimmermann, W. 1980).

*Pseudomonas*ların  $\beta$ -laktam antibiyotiklere verecekleri tepki, bu antibiyotikleri gelişme ortamlarında kullanabilme kabiliyetlerine göre anlaşılabilir. Johnsen, 1977 yılında karbon, azot ve enerji kaynağı olarak benzilpenisilini kullanabilen *P.fluorescens* suşlarını topraktan izole etmiştir. 1980 yılında Beckman

ve Lessie çalışmalarında, kullandıkları tüm *P.cepacia* suşlarının ve bazı *P.marginata* ve *P.caryophylli* suşlarının gelişim için Penisilin G kullanabildiğini göstermiştir. Ancak bu suşların benzilpenisilinden türetilmiş ampisilin ve karbenisillini kullanamadığı ve bu antibiyotiklere dirençli olduğu bulunmuştur (Palleroni, N.J. 1980).

Gentamisin, amikasin ve tobramisin *P.aeruginosa*'lara karşı en etkili aminoglikozit grubu antibiyotiklerdendirler. Bu antibiyotiklerin etki mekanizmaları, protein sentezini inhibe etmeleri şeklindedir. Ancak *P.aeruginosa*'da gentamisin dirençliliğinde en sık görülen mekanizma N-asetilasyon ve O-adenilasyon içeren antibiyotiklerin enzimatik modifikasyonu ve daha az ölçüde etkili olan fosforilasyondur (Garrod, L.P. and Waterworth, P.M. 1969). Bu özellikler incP-2 plazmidleri yanı sıra incP-3 plazmidlerini taşıyan genler tarafından kontrol edilmektedir (Bryan, L.E. 1979). Gentamisine dirençlilikte bu faktörlerin yanı sıra geçirgenlik faktörleride etkili olmaktadır. Gentamisin dışındaki diğer antibiyotiklere dirençlilikte ise antibiyotiklerin modifikasyonu ve geçirgenliğin azalması temel etken olmaktadır (Mathias, R.G. et al. 1976).

*P.aeruginosa* ve diğer pseudomonaslara karşı in vitro olarak test edildiklerinde polimiksinler çok etkili bulunmuşlardır. Fakat in vivo olarak aynı etki gözlenememiştir (Palleroni, N.J. 1980).

### 2.2.9. Mutualistik ve Antagonistik İlişkiler

Pseudomonaslar bazı uygulamalarda kendilerine avantaj sağlayacak bazı antimikrobiyal bileşikler üretselerde diğer grup prokaryotlarla karşılaştırıldıklarında antibiyotik üretimi bakımından zayıftırlar. *P.fluorescens* tarafından üretilen pseudomonik asit ve *P.pyrrocinia* kültürlerinde ortaya çıkarılmış pyrrolnitritin uzun yıllardır bilinmektedir (Imanaka, H. et al. 1965, Fuller, A.T. et al. 1971). Ekolojik çalışmalar toprak veya bitkilerin rizosferlerinde bulunan bazı Pseudomonas türlerinin antagonistik aktivitesi olduğunu göstermiştir ve bazı ilgi çekici bileşikler izole ve karakterize edilmiştir. Pseudomonasların bitki rizosferlerindeki yararlı etkileri bitki



patojen organizmalara karşı ürettikleri antimikrobiyal bileşiklerle sınırlı olmayıp, bazı *Pseudomonas* türleri bitki gelişimine de olumlu etkide bulunmaktadır. (Lugtenbeerg, J.J. and De Weger, L.A. 1992).

Ayrıca çeşitli çalışmalarla *P.fluorescens* (Gurusiddaiah, S. et al. 1986; Bin, L. et al. 1991; Bull, C.T. et al. 1991; Hill, D.S. et al. 1994), *P.syringae* (Harrison, L. et al. 1991), *P.aureofaciens* (Pierson, L.S.I., et al. 1994), *Burkholderia cepacia* (Upadhyay, R.S. et al 1991; Upadhyay, R.S. and Jayaswal, R.K. 1992; Abe, M. and Nakazawa, T. 1994; Burkhead, K.D. et al. 1994; Lee, C. et al. 1994; Lim, Y. et al. 1994) tarafından antifungal aktiviteli bileşiklerin üretildiği açıklanmıştır. Yine yapılan çalışmalarla *P.aeruginosa* (Machan, Z.A. et al. 1992; Allison, D.G.and Nolan, R.D. 1994) ve *B.cepacia* (Aoki, M., et al. 1991) tarafından antibakteriyel, *P.stutzeri* (Hayashida, S., et al. 1991) tarafından da antialgal bileşikler üretildiği açıklanmıştır.

### 2.3. Bazı Pseudomonas Türleri

#### 2.3.1. *Pseudomonas fluorescens*

Bacteria, Proteobacteria, Gammaproteobacteria, Pseudomonadales, Pseudomonadaceae, Pseudomonas, *P.fluorescens*.

##### 2.3.1.1. Tarihçesi

*Pseudomonas fluorescens* 1886 yılında Flügge tarafından *Bacillus fluorescens liqeuofaciens* olarak adlandırılmış, 1889 yılında Trevisan tarafından önce *Bacillus fluorescens* hemen arkasından yine aynı yıl içinde *Bacterium fluorescens* ve sonrasında *Liquidomonas fluorescens* diye de adlandırılmış ve en son Migula tarafından 1895 yılında *Pseudomonas fluorescens* olarak adlandırılmıştır (Skerman, V.B.D. et al. 1980).

### 2.3.1.2. Genel Özellikleri

Bu tür sularda, toprak ve lağım sularında bulunur. Toprak ve suda bulunanları aerop koşullarda, çeşitli karbon kaynakları içeren zenginleştirme besiyerlerinden izole edilebilirler ve bu suşlar anaerobik şartlarda ve nitrat içeren benzer besiyerlerinde geliştirilirse denitrifikasyon yapan biovarlarında izole edilebilir. Genellikle yumurta, et, balık ve süt ürünleri gibi besinlerin bozulmasına sebep olmaktadır. Klinik hastalardan da sıklıkla izole edilmektedir. Bu türün biovar II türlerinden bazıları hastalıklı bitkilerden izole edilmişlerdir ve bunlardan *Pseudomonas marginalis* (Brown 1918) Stevens 1925 tarafından identifiye edilen türler arasında olmuştur. Daha sonraki yıllarda yapılan çalışmalarla bu türün patovaryeteleride bulunmuştur (Palleroni, N.J. 1984). Tipik olarak *P.fluorescens*, Biovar I (Biotip A, Stanier et al., 1966) içinde değerlendirilmekte olup tip tür de bu grubun üyesidir. Biovar II, *Pseudomonas marginalis* suşları yanı sıra saprofitik suşları da içermektedir. Biovar III (Biotip C, Stanier et al., 1966) içerisinde ise dikarboksilik asiti kullanma özelliklerine bağlı olarak farklılaşmış en az iki grup vardır. Biovar IV (Biotip F, Stanier et al., 1966) ise "*P.limonneri*" (Lasseur 1913) Breed 1948 nin tip türünü içermektedir. Günümüzde bu gruplar dışında bilinen bazı suşlar en az iki grup halinde toplanmış ve bu suşlar Stainer et al (1966) tarafından *P. fluorescens* biotip G olarak tanımlanmış ve Biovar V içine dahil edilmişlerdir. Bu biovar besinsel özelliklerine göre farklılıklar gösteren türleri içermektedir ve bu türler arasında bazı önemli karakterler açısından bir veya birden fazla özelliği farklılık gösteren türler bulunmaktadır. Bu biovarın içerdiği bu tip suşların arasında "*P.schuytkilliensis*" ve "*P.geniculata*"(Wright 1895) Chester 1901 sayılabilir. Bu biovarın üyeleri genellikle topraktan izole edilmektedirler (Palleroni, N.J. 1984).

Görünümü *P.aeruginosa*'ya benzemekle beraber bir ucunda fazla sayıda kirpikleri vardır. Kolonileri değişik ve çoğu kez yuvarlak nemli ve parlak yüzeylidir. Sarımsı yeşil ve ultraviyole ışığı altında kuvvetli fluoresans veren üreme gösterir. Bazı kökenleri sarı ve hatta mavi ve fluoresanssız pigment yaparlarsa da piyosiyenin yapmazlar. *P.aeruginosa*'dan farklı olarak CdSO<sub>4</sub> ve tetrazolium'lu agarda

üremezler. Optimum üreme sıcaklığı 25-30°C olup, 42°C'de üremezler fakat 5°C'de üreyebilirler (Bilgehan, H. 2000). *P.fluorescens* amonyum şekerlerinden manitolü kullanıp asit oluşturamaz ve seleniti indirgeyemez. Floresans pseudomonaslar sükrozu levana dönüştürme özelliğine sahip olmayıp, *P.putida*'dan jelatinaz üretmeleri ile ayrılırlar (King, A. and Philips, I. 1978). Lipopolisakkarit yapıları *P.putida* ile çok benzer olup düşük miktarda fosfor içermekte ve buda etilendiamintetraasetikasit (EDTA)'e dirençliliği sağlamaktadır (Wilkinson, S.G., et al. 1973). Glikonatu okside etmeleri ve 37°C'de mukus oluşturamamaları, metilen mavisini renksizleştirememeleri ile de *P.aeruginosa*'dan ayrılık gösterirler. Çeşitli klinik materyallerden fırsatçı patojen olarak elde edilmiştir (Bilgehan, H. 2000).

*P.fluorescens* genellikle gentamisine ve karbenisilline dirençli olup üçüncü jenerasyon sefalosporinlere değişik duyarlılıklar gösterebilir. İmipenem ise yüksek etkili olup yeni çıkan quinolonlar, sparfloksasin ve temafloksasinde aynı etkiyi göstermektedir (Rolston, K.V., et al. 1990).

*P.fluorescens* psikrofilik olup uzun süre buzdolabında canlı olarak saklanabilir. Buna bağlı olarak kan ve kan ürünlerinde üreyerek, damar yoluyla enjekte edildiklerinde ölümlere yol açabilirler (Gottlieb, T. 1993; Monteil, H. and Monteil, C.H. 1997). *P.fluorescens*'in insan kanındaki gelişim hızı 20°C'de 4°C'deki gelişiminden önemli oranda fazladır ve kan transfüzyonu esnasında kontaminasyonlara neden olduğu açıklanmıştır. *P.fluorescens* insanlarda çok sınırlı sayıda yayılıcı hastalığa sebep olmakla birlikte, kanser veya immün sistem hastalarının idrar, dışkı, apse ve kanlarından izole edilebilmektedirler. Bu organizmalar hastane ortamında sıklıkla yerlerden, lağümlardan nadiren hastalardan izole edilmiştir (Monteil, H. and Monteil, C.H. 1997).

*P.fluorescens* suşları tarafından birkaç aktif terapötik bileşik üretildiği belirlenmiştir. Bu enzim yapısındaki ürünler plasmadaki methionin seviyesini düşürerek gelişimi methionine bağlı tümörlerin gelişimini inhibe etmiştir (Hori, H. et al. 1996). Belki de en iyi bilinen bileşikleri antistafilokokkal madde olan mupirosin'dir (Fuller, A.T., et al. 1971). Ayrıca bu suşlardan yüksek derecede aktif antitripanosomal bileşiklerde identifiye edilmiştir (Mercado, T.I., et al. 1986).

### 2.3.2. *Pseudomonas putida*

Bacteria, Proteobacteria, Gammaproteobacteria, Pseudomonadales, Pseudomonadaceae, *Pseudomonas*, *P.putida*.

#### 2.3.2.1. Tarihçesi

*Pseudomonas putida*, ilk olarak 1889 yılında Trevisan tarafından kullanılmış ve 1895 yılında Migula tarafından yayımlanmıştır (Int.J. Syst.Evol.Microbiol., 2001,51,169-170). Bu türün sinonimleri , 1886 yılında Flügge "*Bacillus fluorescens putidus*", 1889 yılında Trevisan "*Bacillus putidus*", 1900 yılında Migula "*Pseudomonas eisenbergii*", 1901 yılında Chester "*Pseudomonas incognita*", "*Pseudomonas ovalis*", "*Pseudomonas rugosa*"ve "*Pseudomonas striata*" olarak gösterilmiştir (Skerman, V.B.D., et al. 1980).

#### 2.3.2.2. Genel özellikleri

Optimum gelişim ısıları 25-30°C'dir. Toprak ve sulardan çeşitli karbon kaynakları ile zenginleştirilmiş mineral besiyerlerinden izole edilirler (Palleroni, N.J. 1984). Bu türün suşları pyocyanin üretmedikleri ve 42°C'de gelişemedikleri için *P.aeruginosa*'dan kolayca ayırt edilebilirler. *P.aeruginosa*'nın tersine birden fazla flagellalı ve hareketlidirler. *P.putida*'nın çoğu suşu nitrat agar besiyerinde gelişemez. *P.putida*, *P.aeruginosa* ve *P.fluorescens*'den jelatini kullanamamasıyla ayrılır (King, A. and Philips, I. 1978). Çoğu suşu sükrozu levana dönüştürür. Lipopolisakkarit yapısı düşük miktarda fosfor içermekte ve buda etilendiamintetraasetikasit (EDTA)'e dirençliliği sağlamaktadır (Wilkinson, S.G., et al. 1973). *P.putida*'nın 2 biotipi identifiye edilmiştir (Palleroni, N.J. 1984). Suşların büyük bir çoğunluğu biovar A (Biotip A, Stanier et al.,1966) içinde yer almaktadır. Bu biovarın G+C oranı %62.5'dur. Biovar B'nin ise G+C oranı %60.7 olup, biovar A'dan sadece birkaç fenotipik özelliği ile farklılık gösterir. Bu biovar'ın bilinen bütün suşları L-triptofan, kynurenine ve anthranilate'ı kullanır ve çoğu D-galaktozu karbon kaynağı olarak

kullanmaktadır. Biovar B'nin hiçbir üyesi nikotinati kullanamaz (Palleroni, N.J. 1984).

*P.putida* genellikle gentamisine dirençli, sulfanomidlere duyarlıdır. Karbenisilline dirençli olup üçüncü jenerasyon sefalosporinlere değişik oranlarda duyarlılıklar gösterebilir. *P.fluorescens*'e olduğu gibi imipenem *P.putida*'ya karşıda yüksek etkili olup yeni çıkan quinolonlar, sparfloksasin ve temafloksasinde aynı etkiyi göstermektedir (Rolston, K.V., et al. 1990).

Psikrofilik olup uzun süre buzdolabında canlı olarak saklanabilirler. Buna bağlı olarak kan ve kan ürünlerinde üreyerek, damar yoluyla enjekte edildiklerinde ölümlere yol açabilirler (Gottlieb, T. 1993; Monteil, H. and Monteil, C.H. 1997). *P. putida* hastane kaynaklı izolasyon yanı sıra genellikle toprak, su ve bitkilerden izole edilir. *P.putida* klinik kaynaklı olarak izole edildiğinde klinik önemi ortaya konamamıştır. Bununla birlikte üriner sistem, deri enfeksiyonları ve bakteriyemilerden izole edilmiştir (Monteil, H. and Monteil, C.H. 1997).

### 2.3.3. *Pseudomonas stutzeri*

Bacteria, Proteobacteria, Gammaproteobacteria, Pseudomonadales, Pseudomonadaceae, *Pseudomonas*, *P.stutzeri*.

#### 2.3.3.1. Tarihçesi

*Pseudomonas stutzeri*, ilk olarak 1896 yılında Lehmann ve Neumann tarafından bulunmuş, 1946 yılında Sijderius tarafından yayımlanmıştır. Bu türün sinonimleri ise 1895 yılında Burri ve Stutzer tarafından "*Bacillus denitrificans* II" , 1896 yılında Lehmann ve Neumann tarafından "*Bacterium stutzeri*", 1900 yılında Migula tarafından "*Bacillus nitrogenus*", 1901 yılında Chester tarafından "*Bacillus stutzeri*", 1923 yılında Bergey ve arkadaşları tarafından "*Achromobacter sewerinii*", 1930 yılında ise "*Achromobacter stutzeri*", 1966 yılında Mandel tarafından "*Pseudomonas stanieri*" olarak verilmiştir (Skerman, V.B.D., et al. 1980). Ayrıca bu

türün 1980 yılında yayımlanmış olan onaylı listedeki en önemli sinonimi *Pseudomonas perfectomarina* (ex ZoBell ve Upham 1944) Baumann et al.1983'dır (Döhler, K., et al. 1987).

### 2.3.3.2. Genel Özellikleri

Taze izole edilmiş kolonileri yapışkan ve karakteristik olarak kıvrımlı şekilde görülür. Besiyerinden besiyerine birkaç kez transferi sonrasında koloniler S tipine dönüşebilir ve renkleri solabilir veya açılabilir. Optimum gelişme sıcaklığı 35°C civarındadır ve bazı suşları 43°C'de gelişir. Tür, besinsel özellikleri ve DNA baz kompozisyonu (DNA'nın G+C oranı % 60.6 - 66.3 arasında) açısından çok çeşitlilik içermektedir. Toprak ve sudan, çeşitli karbon kaynaklarının bulunduğu ve nitrat ilave edilmiş zenginleştirme besiyerlerinden 30°C'de ve anaerobik şartlarda izole edilebilir. L(+)-tartrate zenginleştirmelerinde çok iyi sonuçlar vermelerinin yanı sıra ilginç bir şekilde tartrathlı besiyerlerinde saf kültürü elde edilememektedir. Birçok suşu klinik örneklerden izole edilebilir (Palleroni, N.J. 1984). 1966 yılında Mandel, G+C oranı yaklaşık % 62 olan suşlar için "*P.staineri*" adını önermiştir. Ancak bu tür fenotipik özellikleri temel alınarak *P.stutzeri* olarak daha açık bir şekilde tanımlanmıştır (Palleroni, N.J., et al. 1970).

*P.stutzeri* toprak, su ve hastane ortamından (antiseptikler, enjeksiyon solüsyonları, diyaliz solüsyonları gibi) ve hastalardan kolaylıkla izole edilebilir. Saprofit olduğu için fırsatçı bir patojendir (Monteil, H. and Monteil, C.H. 1997). Bu tür yüksek derecede aktif denitrifikasyon yapan bir toprak organizmasıdır. Boyandığı zaman sıklıkla tek flagellalı bir basil şeklinde görülür. Çoğu nutrient agar kültüründe R veya S formunun yanı sıra ara formlarda yani karışık bir yapıda görülür. Bu nedenle R tipi koloniler *Burkholderia pseudomallei* ile karıştırılabilir ve yaşlı kültürleri parlak kahverengi renk alabilir fakat pigment oluşturmazlar (Dance, D.A.B., et al. 1995). *P.stutzeri* nitratlı sıvı besiyerinde bol miktarda gaz oluşturur fakat *B.pseudomallei*'nin tersine laktozu kullanamaz ve proteolitik değildir. İki türü birbirinden ayıran en önemli özellikler *P.stutzeri*'nin nişastayı hidrolize edememesi ve KCN'e zayıf dirençli olması, *B.pseudomallei*'nin ise kolisine dirençli olmasıdır. Yakın ilişkili toprak mikroorganizmalarından olan *P.mendocina*, S tipi kolonileri

olan, nişastayı hidrolize edemeyen, amonyaktan arginin oluşturan bir türdür. *P.stutzeri* kan, serebrospinal sıvı, tükürük ve idrar gibi çok sayıda klinik kaynaktan izole edilmiştir. Antibiyotiklere karşı diğer pseudomonas türlerine göre çok daha duyarlı olup genellikle ampisilin, karbenisillin ve gentamisine duyarlı, birinci kuşak sefalosporinlere dirençlidirler (Von Graevenitz, A. 1985). *P.aeruginosa*'ya kıyasla quaternary amonyum bileşiklerine oldukça duyarlıdır (Palleroni, N.J., et al. 1970).

## 2.4. Pseudomonaslardan Ayrılan Yeni Genuslara Ait Türler

### 2.4.1. *Stenotrophomonas maltophilia*

Bacteria, Proteobacteria, Gammaproteobacteria, Xanthomonadales, Xanthomonadaceae, *Stenotrophomonas*, *Stenotrophomonas maltophilia*.

#### 2.4.1.1. Tarihçesi

Bu bakterinin taksonomik durumu birçok karışıklık ve tartışmaya konu olmuştur. İlk olarak 1887 yılında Booker tarafından *Bacillus 'A'* olarak izole edilmiş ve 1903 yılında Ford tarafından *Bacillus bookeri* olarak isimlendirilmiştir. Bunun ardından 1926 yılında Levine ve Sappeland tarafından *Bacterium bookeri*, 1927' de Weldin ve 1937' de Kutsher tarafından *Alcaligenes bookeri* olarak isimlendirilmiştir (Robin, T. and Janda, J.M. 1996). Bu organizmanın ilk olarak *Pseudomonas maltophilia* olarak taksonomik açıklanması polar ve peritrik filagella taşıyıp taşımamasına dayalı olarak Hugh ve Ryschenkow tarafından 1961 yılında yapılmış olup, tekrar Hugh tarafından revize edilinceye dek böyle kabul görmüştür (Monteil, H. and Monteil, C.H. 1997).

1983 yılında Swings ve ark. tarafından DNA - rRNA hibridizasyon, DNA guanin-sitozin (G+C) içeriği, hücresel yağ asiti kompozisyonu, enzim testleri, gelişme parametreleri, faj tiplendirme ve ekolojik nişlerine göre yapılan çalışmalardan elde edilen genotipik ve fenotipik verilere bağlı olarak *Xanthomonas maltophilia* türü olarak *Xanthomonas* genusuna dahil edilmiştir (Swings, J. et al. 1983).

Fakat bu genusa dahil edildikten sonra bu türün, *Xanthomonas* türleri ile arasında flagella ve pilus taşıma özelliğine, Xanthamonadin (sarı pigment) ve Xanthan gums (Xanthan zankı) üretmemesi, nitrati nitrite indirgeyebilmesi ve bitki patojeni olması gibi özellikleriyle önemli noktalarda farklılıklar ortaya çıkarılmıştır (Van Zyl, E. and Steyn, P.L. 1992; Palleroni, N.J. and Bradbury, J.F. 1993).

1993 yılında Palleroni ve Bradbury yeni bir genus olan *Stenotrophomonas* genusunu ortaya çıkartmışlar ve *S.maltophilia*'yıda bu genusa üye tek tür olarak göstermişlerdir. Yeni genusun ismini çok sınırlı sayıda besin kaynağını kullanmasından dolayı birkaç substratla gelişebilir manasında *Stenotrophomonas* olarak vermişlerdir (Palleroni, N.J. and Bradbury, J.F. 1993).

#### 2.4.1.2. Genel özellikleri

*S.maltophilia* son zamanlarda önemli derecede hayati tehlikelere yol açan hastane enfeksiyonlarının başlıca etkeni olarak önem kazanmış ve immün sistem hastalarının sayısında artışa neden olmuş bir bakteridir. Hastane ortamındaki nonfermantatif basillere karşı kullanılan imipenem ve birçok  $\beta$ -laktam antibiyotiğe büyük ölçüde direnç geliştirmiştir. Co-trimaksazol, tetrasiklinler, doksisisiklin ve minosiklin ile üçüncü kuşak sefalosporinler bakteriyeye karşı yüksek aktivite göstermekte, antipseudomonal penisilinler ise sadece hafif aktivite göstermektedirler. Bununla birlikte tüm susları aminoglikozidlere dirençlidirler (Khardori, N., et al. 1990).

Düz ya da hafif kıvrık, tek tek yada ikiyeşerli durumda, 1.5 $\mu$ m boyunda, kutupsal ve çok sayıdaki kirpikleri ile çok hareketli, gram olumsuz bir bakteridir. Besiyerlerinde kolay ürerler. Enterobakteriler için kullanılan selektif besiyerlerinde de ürerler. Kolonileri sarımsı renkte de olabilirler (Bilgehan, H. 2000) Nutrient agar besiyerinde 37°C'de opak griden hafif sarımsıya kadar S tipi koloniler, kanlı agarda ise hafif lavanta renkli koloniler şeklinde gelişir. Zorunlu aerop olup 41°C'de üremezler. Methionin gereksiniminden dolayı Koser's sitrat besiyerinde gelişemez. Oksidaz reaksiyonu olumsuz, DNase olumlu olması ile *Pseudomonas*lardan



ayrılırlar. Lizin dekarboksilaz olumlu olup, laktoz, glikoz, ksiloz ve maltoza oksidatif yoldan etkilidirler fakat amonyum-tuz besiyerinde diğer şekerleri kullanamazlar (Bilgehan, H. 2000). *S.maltophilia* esas itibariyle çevrede serbest bir şekilde yayılış gösterip, doğada her yerde bulunur ve genellikle su ve toprak örneklerinden, atık sulardan, petrol bölgelerindeki topraklardan, çiğ süttten (Harf, C. and Monteil, H. 1989), dondurulmuş balıklardan, hayvan ve insan dışkılarından ve bitkilerden (muz, pamuk tohumu, fasulye kabuğundan, tütünden, pirinç kabuklarından ve tahıldan) izole edilebilir. Ayrıca hastane ortamında steril olmayan sulardan, distile sulardan, ıslak yüzeylerden, su musluklarından, respirometrelerden, kullanılmış kataterlerden, nebulizatörlerden, inkübatörlerden ve doku kültürlerinden izole edilebilirler (Von Graevenitz, A.1985; Monteil, H. et al. 1992).

#### 2.4.2. *Chryseomonas luteola*

Bacteria, Proteobacteria, Gammaproteobacteria, Pseudomonadales, Pseudomonadaceae, Pseudomonas, *Pseudomonas luteola* (*Chryseomonas luteola*)

##### 2.4.2.1. Tarihçesi

1985 yılında Kodama ve ark. yaptıkları çalışmada *Pseudomonas luteola* türünü ortaya çıkarmışlardır (Kodama, K. et al. 1985). Bu çalışmanın ardından 1986 yılında yapılan bir çalışmada Holmes ve ark. bu türün daha önce ortaya çıkardıkları yeni bir genus olan *Chryseomonas* genusuna ait tek tür olan *Chryseomonas polytricha*'nın sinonimi olduğunu tespit etmişlerdir. Bu çalışmayı temel alan Holmes ve ark. 1987 yılında *Pseudomonas luteola*'nın *Chryseomonas polytricha*'nın başlıca sinonimi olduğunu bulmuşlar ve bu türün adını *Chryseomonas luteola* olarak değiştirmişlerdir (Holmes, B. et al. 1987). Günümüzde henüz *Chryseomonas* genusu Bergey's Manual of Systematic Bacteriology'de ve onaylı bakteri isimleri listesinde (Approved Lists of Bacterial Names) yer almamaktadır. Bununla birlikte bu genus ile ilgili çalışmalar günümüzde de devam etmekte olup bunlar genellikle 16S rRNA sekans çalışmalarıdır. Bu çalışmalar genellikle bu genus ile *Pseudomonas* ve *Flavimonas* genusları arasındaki ilişkilerin açığa çıkarılması için yapılmaktadır.

Örneğin Anzai ve ark. tarafından 1997 yılında yapılan bir çalışmada, Holmes ve ark. tarafından kullanılan *C.luteola* tip türü ile onaylı listede (Approved Lists of Bacterial Names) yayınlanan *P.aeruginosa* tip türü arasındaki 16S rRNA sekanslarının % 94 oranında benzerlik gösterdiği bulunmuştur. Bu sonuca göre araştırmacılar, *Chryseomonas* genusunun *Pseudomonas* genusunun bir alt sinonimi olabileceği ve bu türünde *Pseudomonas luteola* olarak kullanılmasının daha uygun olacağını önermişlerdir (Anzai, Y., et al. 1997). Ancak bu genusun kesin durumu bundan sonra yayınlanacak ilk onaylı bakteri isimleri listesinin (Approved Lists of Bacterial Names) yayımlanmasından sonra ortaya çıkacaktır.

#### 2.4.2.2.Genel Özellikleri

Kenarları paralel ve uçları yuvarlak basiller şeklindedir. Granül halinde olmayan PHB üretirler fakat hücre içi PHB granülleri bulunmaz. Kapsül veya kılıf üretmezler. Hareketlerini 10-12 peritrik polar flagellaları ile sağlamaktadırlar. Aerop olup, metabolizmaları zorunlu aerop tipindedir. 18-42°C sıcaklıkları arasında gelişebilirler. Katı besiyerinde açık sarıdan koyu sarıya kadar renklerde gelişebilirler. Kolonileri tipik olarak yuvarlak (1mm çaplı), hafif konveks, birkaç suşu R tipi olsada genellikle S tipi ve parlaktır. Katalaz pozitif, oksidaz negatiftirler. Agara gömülmezler. Kemoorganotrof ve oksidatif olarak şekerleri kullanabilirler. Genellikle çevrede çok yaygın olarak bulunmamakla birlikte, nadir olarakta patojen olabildiği insanlarda ve diğer sıcak kanlı hayvanlarda kommensal veya saprofit olarak görülebilirler. Hemoliz yapmazlar. Oksidasyon-fermentasyon besiyerinde oksidatif reaksiyon oluştururlar. Tribütrin, tween 20, tirozin ve jelatini hidrolize ederler. Lesitovitellin agarda parlak koloniler üretmezler. Nitratı indirgeyemezler. İndol negatiftirler. Hidrojen sülfür üretmezler. MacConkey agarda gelişirler. Eskülini hidrolize ederler. Nişastayı hidrolize edemezler. Christensen sitrat besiyerinde alkali üretirler. Simmon's sitrat agarda sitratı kullanırlar. Malonatı kullanırlar. King B besiyerinde fluoresans değildir. Glukonatı oksitleyemez. Arginin dihidrolaz üretirler fakat lizin veya ornitin dekarboksilaz üretmezler. 3-ketolaktoz üretmezler. Seleniti indirgeyemezler. Fenil-alanin deaminaz olumsuzdurlar. B-D-galaktosidaz üretirler fakat fosfotaz üretmezler. Aerop ortamda amonyum tuz besiyerlerinde glukoz,

arabinoz, etanol, fruktoz, gliserol, inositol, maltoz, mannitol, trehaloz ve ksilozdan asit üretirler fakat sellobioz, dulsitol, laktoz ve rafinozdan asit üretemezler. Peptonlu besiyerinde glukozdan gaz üretemezler (Holt, J.G., et al. 1994).

### 2.4.3. *Sphingomonas paucimobilis*

Bacteria, Proteobacteria, Alphaproteobacteria, Sphingomonadales, Sphingomonadaceae, *Sphingomonas paucimobilis*.

#### 2.4.3.1. Tarihçesi

1977 yılında Holmes ve ark. tarafından *Pseudomonas paucimobilis* olarak isimlendirilmiş olan bu türün adı (Skerman, V.B.D., et al.1980). 1990 yılında Yabuuchi ve ark. tarafından *Sphingomonas paucimobilis* olarak değiştirilmiştir (Yabuuchi, E. et al. 1990).

#### 2.4.3.2. Genel Özellikleri

0.7 X 1.4µm büyüklüğünde genellikle tek veya çiftler halinde bulunan ve polar kamçılarıyla hareket eden basillerdir. 18-22°C'de hareketlilikleri gözlenirken, 37°C'de hareketsizdirler. Ürettikleri suda çözülmeyen sarı pigmentler fluorescens olmayıp, spektrofotometrik ölçümlerde metanolde 452 ve 479 nm'de maksimum absorbans verir. 37°C'de gelişirken 5°C'de ve 42°C'de gelişemez. Optimum gelişme sıcaklığı ise yaklaşık 30°C'dir. Oksidaz reaksiyonu pozitifdir. Katalaz ve DNase üretirler. Tween 20 ve 80'i hidrolize ederler. Lesitinaz reaksiyonu negatifdir. Nitratı nitrite indirgemezler. PHB içerdiği tahmin edilen lipitler üretirler. Jelatini eritemez ve kazeini sindiremezler. Nişastayı hidrolize ederler. Arginin dihidrolaz, arginin desimidaz, lisin dekarboksilaz ve ornitin dekarboksilaz üretmezler. 3-ketolaktoz üretmezler. Mineral besiyerinde arabinoz, sellobioz, etanol, fruktoz, glukoz, laktoz, maltoz, rafinoz, salisin, sukroz, trehaloz ve ksilozdan asit üretirken adonitol, dulkitol,

inositol, mannitol, sorbitol, gliserol ve ramnozdan asit üretemezler (Holt, J.G., et al. 1994).

*Sphingomonas paucimobilis* sarı pigmentli, fermentatif olmayan ve hareketlilik özelliğinin çok zor görülmesine bağlı olarak *Flavobacterium* türleriyle karıştırılabilen bir türdür (Holmes, B. et al. 1977). Hücreler ancak asılı damla preparasyonlarında küçük oranda aktif olarak hareketlidirler. Sıklıkla çevreden ve yaraların yıkanmasında kullanılan su veya tuzlu solüsyonlardan izole edilmiştir. Çoğu suşu eritromisin, tetrasiklin, kloramfenikol ve aminoglikozidlere duyarlı fakat üreidopenisilinlere ve ilk kullanılan sefalosporinlere dirençlidir (Collier, L., et al. 1998).

#### 2.4.4. *Methylobacterium mesophilicum*

Bacteria, Proteobacteria, Alphaproteobacteria, Rhizobiales,  
Methylobacteriaceae, Methylobacterium, *Methylobacterium mesophilicum*.

##### 2.4.4.1. Tarihçesi

*Methylobacterium* genusu 1980 yılında yayımlanan onaylı liste “Approved Lists of Bacterial Names”de (Skerman, V.B.D., et al. 1980) yer almasına rağmen Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology’de yer almamaktadır. Tip türü *Methylobacterium organophilum*’dur. Bu genusa 1983 yılında Green ve Bousfield tarafından *M.rhodinum* (eski adıyla *Pseudomonas rhodos*), *M.radiotolerans* (eski adıyla *Pseudomonas radiora*) ve *M.mesophilicum* (eski adıyla *Pseudomonas mesophilica*) türleri eklenerek yeniden düzenlenmiştir (Green, P.N. and Bousfield, U. 1983). 1984 yılında Uragami ve Komogata, Protomonas adını verdikleri ve sadece *P.extorquens* (eski adıyla *Pseudomonas extorquens*) olmak üzere tek tür içeren yeni bir genus ortaya atmışlardır (Uragami,T. and Komogata, K. 1984). Fakat 1985 yılında bu genus ve üyeleri Bousfield ve Green tarafından *Methylobacterium* genusuna dahil edilmişlerdir ( Bousfield and Green 1985). Böylece *P.extorquens*,

*Methylobacterium extorquens* olarak değiştirilmiştir. En son olarak 1988 yılında Green ve ark. bu genusa *M.rhodesianum*, *M.zatmanii* ve *M.fujisawaense* olmak üzere 3 yeni tür eklemiştir (Green, P.N. et al. 1988).

#### 2.4.4.2. Genel Özellikleri

0.8-1.0 X 1.0-8.0µm boyutlarında genellikle tek bazen rozetler halinde görülebilen basillerdir. Bazı suşları hareketli olmamakla birlikte hareketlerini polar, subpolar veya lateral flagellasıyla yaparlar. Hücreler büyük miktarda sudanofilik yapı bazende volutin granülleri içerirler. Çoğu suş gram reaksiyonu olarak değişken sonuç vermekle birlikte hücreler gram negatif boyanırlar. Suşların gelişimi yavaş olmakla birlikte bazı suşlar nutrient agarda hiç gelişmez. Gliserol-pepton agarda koloniler 1-3 mm çapında ve açık pembeden parlak turuncu-kırmızıya kadar değişebilen renkler alırlar. Koloniler metanol-tuzlu agarda ise değişmez bir şekilde açık pembe renk alırlar. Muhtemelen karotenoid yapıda ve suda çözülmeyen pigmentler üretirler. Sıvı besiyerinde ise yüzeyde pembe bir halka veya ince bir zar oluştururlar. Zorunlu aerob olup katalaz ve oksidaz (genellikle zayıf) pozitifler. Kemoorganotrof, fakültatif metilotrof ve genellikle fakültatif metanotrofturlar. Bazı suşlar metanı tek karbon kaynağı olarak kullanabilmektedirler. Elde edilen bu enerji suşlar inorganik bir besiyerinde değilse metanlı ortamlarda kolayca harcanmaktadır. Bazı suşların homoizositrat yoluyla C1 bileşiklerini asimile ettikleri ve kompleks inorganik substratlarda geliştirildiklerinde trikarboksilik asit döngüsünü tamamladıkları görülmüştür. Bu genusun üyeleri topraktan, atıklardan, tatlı sulardan, göl sedimentlerinden, yaprak yüzeyi ve nodullerinden, pirinçten, havadan ve hastane ortamından izole edilmiştir. Optimum gelişme sıcaklığı 25-30°C'dir (Holt, J.G., et al. 1994).

### 3. MATERYAL VE METOT

#### 3. 1. MATERYAL

##### 3. 1. 1. Bakteriler

Çalışmada kullanılan bakteriler Muğla Üniversitesi Kültür Koleksiyonundan (MUKK) elde edilmiştir. Bu bakteriler, Haziran 2000 – Mayıs 2001 tarihleri arasında Muğla, Yuvarlakçay'dan yakalanan yılan balığı (*Anguilla anguilla* L., 1758) örneklerinin derilerinden izole edilmiştir. Ön identifikasyon testleriyle *Pseudomonas* generisi ve non-fermentatif Gram negatif bakteriler olarak sınıflandırılan bu 40 adet bakteri çalışmaya dahil edilmiş ve yapılan identifikasyon işlemleri sonucu bu suşların 28 adedi *Pseudomonas* ve *Pseudomonas* generisinden yeni ayrılmış generis üyesi türlere ait suşlar olarak tespit edilmiştir. Çalışmaya alınan bu suşların 4 adedi *Pseudomonas fluorescens*, 3 adedi *Pseudomonas putida*, 1 adedi *Pseudomonas stutzeri*, 11 adedi *Stenothrophomonas maltophilia*, 5 adedi *Chryseomonas luteola*, 2 adedi *Sphingomonas paucimobilis* ve 2 adedi *Methylobacterium mesophilicum* olarak tespit edilmiştir. Suşlar Tablo 2'de daha açık bir şekilde verilmiştir.

Bu suşlar, iki farklı şekilde muhafazaya alınmıştır. Stok şeklinde kullanılmak üzere *Methylobacterium* türleri %1 gliserol içeren Nutrient agar yatık besiyerinde, diğer suşlar ise Nutrient agar yatık besiyerinde +4°C'de muhafaza edilmişlerdir. Ayrıca mikroorganizmaların, 30°C'de 24 saat inkübasyon sonucu elde edilen saf kültürleri, % 20'lik gliserol - saf su solüsyonunda, 1/1 oranında karıştırılarak -20°C'de muhafaza edilmişlerdir (Palleroni, N.J. 1984).

Tablo 2. Çalışmada kullanılan mikroorganizmalar

Suş No	Suş
MU 18	<i>Chryseomonas luteola</i>
MU 23	<i>Stenothrophomonas maltophilia</i>
MU 25	<i>Stenothrophomonas maltophilia</i>
MU 52	<i>Stenothrophomonas maltophilia</i>
MU 53	<i>Stenothrophomonas maltophilia</i>
MU 56	<i>Chryseomonas luteola</i>
MU 58	<i>Chryseomonas luteola</i>
MU 63	<i>Stenothrophomonas maltophilia</i>
MU 64	<i>Stenothrophomonas maltophilia</i>
MU 65	<i>Chryseomonas luteola</i>
MU 66	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
MU 67	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>
MU 69	<i>Stenothrophomonas maltophilia</i>
MU 70	<i>Pseudomonas stutzeri</i>
MU 73	<i>Pseudomonas putida</i>
MU 75	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
MU 83	<i>Pseudomonas putida</i>
MU 87	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
MU 94	<i>Stenothrophomonas maltophilia</i>
MU 96	<i>Chryseomonas luteola</i>
MU 97	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
MU 99	<i>Stenothrophomonas maltophilia</i>
MU 136	<i>Stenothrophomonas maltophilia</i>
MU 137	<i>Stenothrophomonas maltophilia</i>
MU 139	<i>Pseudomonas putida</i>
MU 140	<i>Methylobacterium mesophilicum</i>
MU 141	<i>Methylobacterium mesophilicum</i>
MU 145	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>

### 3.1.2. Çalışmada Kullanılan Besiyerleri

Besiyerleri 121°C'de 15dk sterilize edilmiştir.

#### a) Nutrient Broth (NB)(Difco) içeriği

Peptone	5 g
Yeast extract	2 g
Meat extract	1 g
Sodyum klorit	5 g
Distile su	1000 ml
	pH = 7.4

NB besiyeri bakterilerin aktifleştirilmesi için kullanılmıştır. NB besiyerine 15 g agar ilavesi ile Nutrient Agar (NA) besiyeri elde edilmiştir. NA besiyeri bakterilerin koloni morfolojilerinin tespiti ve stoklanması için kullanılmıştır. Ayrıca *Methylobacterium* türlerinin aktifleştirilmesi için NB besiyerine %1 gliserol ilave edilmiş aynı zamanda bu bakterilerin saklanması için kullanılan NA besiyerine de aynı oranda gliserol ilavesi yapılmıştır. Bakterilerin metallere dirençliliklerinin tespitinde ise yarım kuvvetli NA kullanılmıştır.

#### b) Sitrat Agar (Simmons Citrate Agar)içeriği (Difco)

Sodyum sitrat	2 g
Sodyum klorür	5 g
MgSO <sub>4</sub>	0.2 g
NH <sub>3</sub> . H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1 g
Brom timol mavisi	0.08 g
Agar	15 g
Distile su	1000 ml
	pH : 6.9



Bakterilerin sitrat testi için kullanılmıştır.

**c) Metil Green DNase Agar (Difco)**

Triptoz	20 g
Sodyum klorit	5 g
Deoksiribonükleik asit	2 g
Metil gren	0.05 g
Agar	15 g
Distile su	1000 g
	pH : 7.4

Bakterilerin DNase testi için kullanılmıştır.

**d) Müller- Hinton Agar içeriği (Difco)**

Beef dehydrated infusion	300 g
Kazein hidrolizat	17.5 g
Nişasta	1.5 g
Agar	17 g
Distile su	1000 ml
	pH : 7.4

Bakterilerin antibiyotik duyarlılık testlerinde kullanılmıştır.

**3.1.3. Hidrojen Peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)**

Katalaz testi için Hidrojen peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) kullanılmıştır.

**3.1.4. İdentifikasyonda Kullanılan Test Kitleri**

İdentifikasyonda enterik olmayan gram negatif basiller için spesifik olan biyokimyasal test kitleri (Api 20NE Biomerieux) ve enzim aktivite araştırma sistemi (API ZYM Biomerieux) kullanılmıştır.

### 3.1.4.1. Api 20NE (Biomerieux)

API 20 NE sistemi Enterobacteriaceae familyası dışındaki gram negatif genusların (*Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Flavobacterium*, *Moraxella*, *Vibrio*, *Aeromonas* vb.) identifikasyonu için hazırlanmış, 8 geleneksel ve 12 asimilasyon testini içeren standardize edilmiş bir mikrometot sistemidir. API 20 NE veritabanı *Brucella* ve *Francisella* gibi gelişimleri için özel besinleri ve ön uyarıları gerektiren genusları kapsamamaktadır. Böyle türlerin varlığı için ekstra deneyler ve doğrulama testleri yapılması gerekmektedir.

API 20 NE stripleri kurutulmuş besiyeri ve substrat içeren 20 mikrotüpten oluşmaktadır. Geleneksel testlerle elde edilmiş saf bakteri kolonilerinden, steril tuzlu su süspansiyonları hazırlanarak bu mikrotüplere inoküle edilmiştir. İnkübasyon esnasında metabolizma kendiliğinden veya ayıraçlara bağlı olarak renk değişikliğine sebep olmaktadır. Asimilasyon testleri için ise AUX besiyeriyle karıştırılarak inoküle edilen bakteriler eğer substratı kullanabilirlerse gelişebilmektedirler.

#### API 20 NE Test Kitini Oluşturan Öğeler :

- 25 API 20 NE stripi
- 25 İnkübasyon kutusu
- 25 ampul API 20 NE (AUX) besiyeri
- 25 adet sonuç tablosu
- Mineral yağ
- McFarland standart sıvısı

#### AUX Medium içeriği :

- |                       |         |
|-----------------------|---------|
| - Amonyum sülfat      | 2 g     |
| - Agar                | 1.5 g   |
| - Mineral base        | 82.8 mg |
| - Amino asit          | 250 mg  |
| - Vitaminler ve diğer | 35.9 mg |

- Fosfat buffer                    0.04 M
  - Distile su                        1000 ml
- pH : 7.1

Stripler ve API 20 NE (AUX) Medium 2-8°C arasında buzdolabında muhafaza edilmiştir.

#### Ayıracılar ve İçerikleri

James	J 2183 bileşiği	0.5 g
(5 ml)	HCl (1 N)	100 ml
NIT 1	Sülfanilik asit	0.4 g
(5 ml)	Asetik asit	30 g
	H <sub>2</sub> O	70 ml
NIT 2	N,N-dimetil-1-naftilamin	0.6 g
(5ml)	Asetik asit	30 g
	H <sub>2</sub> O	70 ml
Zn	Çinko tozu	10 g

NIT 1 ve Zn ayıracıları oda sıcaklığında, James ve NIT 2 ayıracıları ise 2-8°C arasında karanlık bir ortamda buzdolabında muhafaza edilmiştir. James ayıracı ışığa karşı çok duyarlı olduğu için şişesi alüminyum folyo ile sarılarak buzdolabında muhafaza edilmiştir. Bu ayıracın normal rengi sarıdır ve uzun süreli olarak buzdolabı dışında tutulması sakıncalıdır. Pembe renk oluşması bu ayıracın bozulmasına işaret eder. API 20 NE striplerindeki reaksiyonlar ve sonuçları Tablo 3’de verilmiştir.

Tablo 3. API 20 NE Striplerindeki Reaksiyonlar ve Sonuçlar

TEST	SUBSTRAT	REAKSİYON/ ENZİMLER	SONUÇ	
			Negatif	Pozitif
NO <sub>3</sub>	Potasyum nitrat	Nitratın nitrite redüksiyonu	<u>NIT 1+NIT 2 / 5 dk</u> Renksiz Pembe-kırmızı	
		Nitratın nitrojene redüksiyonu	<u>Zn / 5 dk</u> Pembe Renksiz	
TRP	Triptofan	İndol üretimi	James / Renksiz/ açık yeşil/ sarı	hızlı reaksiyon pembe
GLU	Glukoz	Asidifikasyon	Mavi/yeşil	Sarı
ADH	Arginin	Arginin dihidrolaz	Sarı	Turuncu/pembe /kırmızı
URE	Üre	Üreaz	Sarı	Turuncu/pembe /kırmızı
ESC	Eskülin	Hidroliz ( $\beta$ -glukosidaz)	Sarı	Gri/kahve/siyah
GEL	Jelatin	Hidroliz (Proteaz)	Pigment difüzyonu yok	Siyah pigment difüzyonu
PNPG	p-nitrofenil- $\beta$ -D- galaktopyranosit	B-galaktozidaz	Renksiz	Sarı
GLU	Glukoz	Asimilasyon	Şeffaf	Opak
ARA	Arabinoz	Asimilasyon	Şeffaf	Opak
MNE	Mannoz	Asimilasyon	Şeffaf	Opak
MAN	Mannitol	Asimilasyon	Şeffaf	Opak
NAG	N-asetil glukozamin	Asimilasyon	Şeffaf	Opak
MAL	Maltoz	Asimilasyon	Şeffaf	Opak
GNT	Glukonat	Asimilasyon	Şeffaf	Opak
CAP	Kaprat	Asimilasyon	Şeffaf	Opak
ADI	Adipat	Asimilasyon	Şeffaf	Opak
MLT	Malat	Asimilasyon	Şeffaf	Opak
CIT	Sitrat	Asimilasyon	Şeffaf	Opak
PAC	Fenil-asetat	Asimilasyon	Şeffaf	Opak
OX	Oksidaz	Sitokrom oksidaz	Renksiz	Koyu mavi/mavi

### 3.1.4.2. API ZYM (Biomerieux)

API ZYM enzimatik aktivitelerin araştırılması için geliştirilmiş yarı nicel bir mikro metottur. Bu teknik mikroorganizmalar, hücre süspansiyonları, dokular, biyolojik sıvılar gibi birçok örneğe uygulanabilir. Bu sistem çok küçük miktarda örnekler kullanarak, 19 enzimatik reaksiyonun hızlı bir şekilde çalışılmasına ve sistematığının yapılmasına imkan tanımaktadır. Sistem, 20 adet küçük kuyucuk (cupule) içeren striplerden ve enzimatik substrat ve buffer'larını içeren besiyerlerinden oluşmaktadır. Bu besiyerleri enzimlerle genellikle suda çözünmeyen substratların karışmasını sağlamaktadır.

API ZYM stripleri, enzimatik reaksiyonların çalışılması için spesifik olarak hazırlanmış 20 kuyucuktan oluşmaktadır. Sentetik substratlar içeren bu striplerin tabanları fiber yapısındadır. Bu taban yapısı suda çözünmeyen substratların bile enzimatik reaksiyon göstermesine imkan tanımaktadır. Enzimatik testler mikroorganizmaların yoğun süspansiyonlarının inokülasyonu ile yapılmaktadır. İnkübasyon süresi esnasında üretilen metabolik son ürünler, ayıraçların eklenmesi sonrasında meydana gelen renk değişikliklerine göre tespit edilir.

API ZYM Sistemi Şunlardan Oluşmuştur :

- 25 API ZYM stripi
- 25 İnkübasyon kutusu
- 25 NaCl ( %0.85'lik) solüsyonu
- 25 sonuç kağıdı
- McFarland standart sıvısı

Stripler kullanılıncaya kadar 2-8°C'de saklanmıştır.

### Ayır lar ve İçerikleri

ZYM A	Tris-hidroksimetil-aminometan	25 g
(8 ml)	Hidroklorik asit (%37)	11 ml
	Sodyum lauryl sulfat	10 g
	H <sub>2</sub> O	100 ml
ZYM B	Fast Blue BB	0.35 g
(8 ml)	2-metoksietanol	100 ml

Ayır lar kullanılıncaya kadar 2-8°C arasında karanlık bir ortamda buzdolabında muhafaza edilmiştir. ZYM B ayıracı ışığa karşı çok duyarlı olduğu için alüminyum folyo ile sarılarak buzdolabında muhafaza edilmiştir. Bu ayıracın uzun süreli olarak buzdolabı dışında tutulması sakıncalıdır. Normal rengi sarı olup pembe renk alması bozulduğuna işarettir. ZYM A ayıracınında buzdolabında saklanması esnasında kimyasal özelliklerinde değişikliğe neden olmaksızın  okelme meydana gelebilir fakat bu  okelme ayıracın oda ısısına ulaşmasıyla kendiliğinden kaybolur. API ZYM sisteminde bulunan reaksiyonlar ve sonuçları Tablo 4'de verilmiştir.

### 3.1.5. Antibiyogramda Kullanılan Antibiyotikler

Çalışmada kullanılan antibiyotik diskleri Oxoid firmasına ait ticari disklerdir. Suşların antibiyotiklere dirençlilik ve duyarlılıklarının tespiti için kullanılan antibiyotik diskleri ve konsantrasyonları Tablo 5'de verilmiştir.

Tablo 4. API ZYM Sistemindeki Enzimler ve Reaksiyon Sonuçları

No	ENZİM	SUBSTRAT	pH	SONUÇ	
				Pozitif	Negatif
1	Kontrol			Renksiz yada karışım olmadıysa örnek renginde	
2	Alkalın fosfataz	2-naphthyl phosphate	8.5	Viyole	
3	Esteraz(C 4)	2-naphthyl butyrate	6.5	Viyole	
4	Esteraz lipaz (C 8)	2-naphthyl caprylate	7.5	Viyole	
5	Lipaz (C 14)	2-naphthyl myristate	7.5	Viyole	
6	Leucine arylamidase	L-leucyl-2-naphthylamide	7.5	Turuncu	
7	Valine arylamidase	L-valyl-2-naphthylamide	7.5	Turuncu	
8	Cystine arylamidase	L-cystyl-2-naphthylamide	7.5	Turuncu	
9	Tripsin	N-benzoyl-DL-arginine-2-naphthyl	8.5	Turuncu	
10	$\alpha$ -chymotrypsin	N-glutaryl-phenylalanine-2-naphthyl	7.5	Turuncu	Renksiz
11	Acid phosphatase	2-naphthyl phosphate	5.4	Viyole	veya
12	Naphthol-AS-BIphosphohydrolase	Naphthol-AS-BI-phosphate	5.4	Mavi	açık sarı
13	$\alpha$ -galactosidase	6-Br-2-naphthyl- $\alpha$ D-galactopyra	5.4	Viyole	
14	$\beta$ -galactosidase	2-naphthyl- $\beta$ D-galactopyranosid	5.4	Viyole	
15	$\beta$ -glucuronidase	Naphthol-AS-BI- $\beta$ D-glucuronid	5.4	Mavi	
16	$\alpha$ -glucosidase	2-naphthyl- $\alpha$ D-glucopyranoside	5.4	Viyole	
17	$\beta$ - glucosidase	6-Br-2-naphthyl- $\beta$ D-glucopyran	5.4	Viyole	
18	N-acetyl- $\beta$ - glucosaminidase	1-naphthyl-N-acetyl- $\beta$ D-glucosa	5.4	Kahverengi	
19	$\alpha$ -mannosidase	6-Br-2-naphthyl- $\alpha$ D-mannopyra	5.4	Viyole	
20	$\alpha$ -fucosidase	2-naphthyl- $\alpha$ L-fucopyranoside	5.4	Viyole	

Tablo 5. Çalışmada Kullanılan Antibiyotik Diskleri ve Konsantrasyonları

Antimikrobik Madde	Sembol	Konsantrasyon
Mezlosillin	MEZ	75 mcg
Piperasillin	PRL	100 mcg
Tikarsilin+klavulanik asit	TIM	75+10 mcg
Seftazidim	CAZ	30 mcg
Sefepim	FEP	30 mcg
Seftriakson	CRO	30 mcg
Sefotaksim	CTX	30 mcg
Sefalotin	KF	30 mcg
İmipenem	IPM	10 mcg
Aztreonam	ATM	30 mcg
Penisilin	P	10 U
Amikasin	AK	30 mcg
Tobramisin	TOB	10 mcg
Netilmisin	NET	30 mcg
Gentamisin	CN	10 mcg
Tetrasiklin	TE	30 mcg
Siprofloksasin	CIP	5 mcg
Norfloksasin	NOR	10 mcg
Kloramfenikol	C	30 mcg
Trimetoprim+sulfametaksazol	SXT	1.25+23.75 mcg
Trovafloksasin	TVA	10 mcg
Ampisillin	AM	10 mcg



## **3. 2. METOT**

### **3. 2. 1. İzolatların Teşhisi ve Doğrulama Deneyleri**

Muğla Üniversitesi Kültür Koleksiyonundan temin edilen bakteriler Nutrient broth besiyerinde aktifleştirilerek, Nutrient agar'a inoküle edilmiş ve plaklar 24 saat 30°C'de inkübasyona bırakılmıştır. Üreme görülen plaklardaki bakteriler koloni morfolojileri, mikroskopik görüntüleri ve bazı fizyolojik özelliklerine göre sırasıyla aşağıdaki testlere tabi tutulmuşlardır.

#### **3.2.1.1. Koloni morfolojisi**

Bakteriler ilk olarak NB besiyerine inoküle edilmiş, 24 saat 30°C'de inkübasyona bırakılmıştır. NB besiyerinde aktifleştirilen bakteriler NA besiyerine tek koloni ekim yapılarak 30°C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Üreme gösteren bakterilerin, koloni büyüklüğü, tipi ve pigment üretimleri kaydedilmiştir. Ayrıca bu kolonilerden lam üzerine yayma preparat hazırlanarak mikroskopik görüntüleri kontrol edilmiştir. Bakterilerin bu özellikleri Tablo 6'da verilmiştir.

#### **3.2.1.2. Oksidaz testi**

Bakteriler bir gece NA besiyerinde geliştirilmiştir. N,N dimetilfenilendiamin dihidrokloridin % 1'lik solüsyonu hazırlanarak, kurutma kağıdına emdirilmiştir. Islak kurutma kağıdı üzerine, gelişen kolonilerden öze ile alınarak sürülmüş ve mor renk oluşumu gözlenmiştir. 5-10 saniyelik bir süre içinde mor renk oluşumu gözlendiğinde test pozitif olarak kabul edilmiştir. Ayrıca zayıf ve negatif reaksiyon veren bakterilerin kolonilerine oksidaz çubuğu (Oxoid) kullanılarak test tekrarlanmış ve kontrol edilmiştir (Collins, C.H. et al. 1995).

### 3.2.1.3. Katalaz testi

Katalaz enzimi oluşturan bakteriler hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ )'i su ve oksijene ayırıştırırlar. Çalışmada katalaz testi lam yöntemiyle yapılmıştır (Bilgehan, H. 1995). NA besiyerinde 24 saat geliştirilen bakteri kolonilerinden serum fizyolojik ile lam üzerinde hazırlanan süspansiyon üzerine %3  $H_2O_2$  damlatıldığında hava kabarcıklarının çıkması pozitif reaksiyon olarak kabul edilmiştir.

### 3.2.1.4. Sitrat testi

Sitrat kullanımını test etmek için Simmons sitrat agar (Difco) kullanılarak çizgi ekim yapılmış ve inkübasyondan sonra besiyerinin mavi renge dönüşümü pozitif reaksiyon olarak kabul edilmiştir (Collins, C.H. et al. 1995).

### 3.2.1.5. DNase testi

Bakteriler, Methyl Green DNase test agara çizgi ekim yapılarak  $35^{\circ}C$ 'de 24 saat inkübe edilmiştir. DNase aktivitesi gösteren kolonilerin çevresinde çizgi halinde bir şeffaflaşma ve renkte açılma gözlenmiştir (Collins, C.H. et al. 1995).

## 3.2.2. API 20 NE İdentifikasyon Testi

Suşların tür düzeyindeki identifikasyonları, Enterobacteriaceae familyası dışındaki Gram negatif basiller için spesifik olan minyatürize edilmiş biyokimyasal test kitleri (API 20 NE) ile yapılmıştır.

Bu amaçla nutrient broth besiyerinden saf kültürler nutrient agar besiyerine ekilerek aktif hale getirilmişlerdir. Bu petriyelerden öze kullanılarak 1-4 koloni daha önceden kullanıma hazırlanmış 2 ml'lik % 0.85'lik steril serum fizyolojik tüplerine inoküle edilmiş ve steril mikropipetler kullanılarak 0.5 McFarland bulanıklığında homojen bir süspansiyon hazırlanmıştır. Bu süspansiyondan aynı pipetle  $NO_3$

testinden PNPG testine kadar hava kabarcığı kalmayacak şekilde sadece tüp kısımlarına inokülasyon yapılmıştır. Daha sonra bu süspansiyondan yaklaşık 200µl AUX Medium'a eklenerek hava kabarcığı oluşturmayacak şekilde karışım sağlanmıştır ve bu karışım kalan GLU testinden PAC testine kadar hem tüp hemde cupule kısımları dolacak şekilde inoküle edilmiştir. Cupule kısımlarının konveks ya da konkav olmaması, düz bir şekil alması sağlanmıştır. Son olarak GLU , ADH ve URE testleri için anaerobik ortam sağlamak amacıyla mikrotüplerin cupule kısımları konveks menisküs şeklinde mineral yağ ile doldurulmuştur.

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

İnkübasyon sonunda GLU , ADH, URE, ESC, GEL ve PNPG test sonuçları kaydedilmiştir. NO<sub>3</sub> testi için ise önce NIT 1 hemen ardından NIT 2 ayıraçları damlatılarak 5dk beklenmiş, eğer sonuç negatif ise 2-3 mg Zn ayırıcı eklenerek 5 dk sonra tekrar sonuç alınmıştır. TRP testi için kuyucuğa bir damla James ayırıcı damlatılarak reaksiyon sonucu hemen kaydedilmiştir. Asimilasyon testlerinde ise cupule kısmında opak renk görülmesi bakteriyel gelişmenin pozitif olduğunun göstergesidir. 24 saatlik inkübasyon sonunda yapılan bu işlemlerin ardından ayıraç eklenen test tüpleri mineral yağ ile kapatılarak 24 saat daha inkübe edilmiş ve 48 saat sonunda sonuçlar tekrar kaydedilmiştir. Gelişen bütün reaksiyonlar Tablo 3'e göre okunmuştur. Sonuçlar sonuç çizelgelerine kaydedilmiştir.

İdentifikasyonda tür tespiti, elde edilen sonuçların analitik profil indeksiyle karşılaştırılmasıyla yapılmaktadır. Analitik profilde bütün reaksiyon şekilleri numerikal profil içinde kodlanmış olmalıdır. Sonuç çizelgelerinde testler 3 testlik gruplar halinde ayrılmışlar ve gruptaki testler 1, 2 ve 4 sayılarını kodlayacak şekilde numaralandırılmıştır. Her grup içindeki sonuçlara bağlı olarak ortaya 7 haneli bir sayı ortaya çıkmaktadır. 21. test oksidaz testi olup 4 sayısı ile kodlanmıştır.

### 3.2.3. API ZYM Enzim Testi

Suşların enzimatik aktivitelerinin tespiti için enzimatik aktivitelerin araştırılması için spesifik olarak minyatürize edilmiş bir sistem olan API ZYM kullanılmıştır.

Bu amaçla saf olarak nutrient agar besiyerinde geliştirilmiş olan kültürlerden, 2 ml'lik % 0.85'lik steril serum fizyolojik tüplerine inokülasyon yapılarak 5-6 McFarland bulanıklığında homojen bakteri süspansiyonları hazırlanmıştır. Bu bakteri süspansiyonundan steril mikropipet kullanılarak her cupule'e yaklaşık olarak 65µl inokülasyon yapılmıştır.

Bir tabla ve bir kapaktan oluşan inkübasyon kaplarında nemli bir ortam sağlamak amacıyla 5ml distile su petekli yapıdaki tablaya dağıtılmıştır. Mikrotüplerden oluşan stripler bu tablalara yerleştirilerek kapakları kapatılmıştır. Suş numaraları inkübasyon kutularına yazılarak suşların karışması önlenmiş ve 37°C'de 4 saat inkübe edilmiştir.

İnkübasyon sonunda striplere sırayla bir damla ZYM A ve ZYM B ayıraçları damlatılmış ve renk değişikliklerinin ortaya çıkması için en az 5 dk beklenmiştir. Renk gelişimleri meydana gelen rengin tonuna göre 5 derece üzerinden değerlendirilmiş, 3 ve üzeri renk dereceleri pozitif olarak değerlendirmeye alınmıştır. Sonuçların alınmasının ardından stripler 24 saat daha inkübasyonda tutularak sonuçlar tekrar kontrol edilmiştir. Gelişen bütün reaksiyonlar Tablo 4'e göre okunmuş ve sonuçlar sonuç çizelgelerine kaydedilmiştir.

### 3.2.4. Antibiyotik Duyarlılıkları :

Antibiyotik duyarlılığı epidemiyolojik araştırmalarda kullanılacak standart bir yöntem olarak bakteri tipine göre kullanılabilir. Antibiyogramın standart ve kesin sonuçlar sağlaması bu tekniği hastanelerdeki epidemiyolojik paternlerin zaman ve yerleşim boyutlarında sınıflandırarak analizine yönlendirmiştir. Bu nedenle antibiyogram, klasik olarak klinikte kullanımına göre oldukça yararlı bir epidemiyolojik yöntem olarak uygulama ve bu yönde gelişme potansiyeline sahiptir (Collier, L., et al. 1998).

#### 3.2.4.1. Antibiyotik Duyarlılık Deneyleri :

Elde edilen suşların antibiyotiklere duyarlılıklarının belirlenmesi amacıyla disk difüzyon yöntemi kullanılmıştır (Bauer, A.W., et al. 1966). Kültür plağındaki koloniler öze ile sıvı besiyerine aktarılmıştır. Sıvı besiyerindeki kültürler 30°C'de bulanıklık 0.5 McFarland standart bulanıklığına ulaşınca kadar inkübe edilmiştir. Suşların bu sıvı besiyerindeki kültürleri % 1 (10<sup>6</sup> bak/ml) oranında 45-50°C'ye kadar soğutulmuş Mueller-Hinton Agar'a ilave edilmiş ve steril petri kaplarına 15'er ml dağıtılmıştır. Ekim yapılmış agar plaklarına besiyeri yüzeyi kurutulduktan sonra antibiyotik diskleri steril bir pens ile yerleştirilmiştir. Yaklaşık olarak 20 dakika disklerdeki antimikrobiyal etkenin diffüze olması beklendikten sonra 37°C'de bir gece inkübasyondan sonra disklerin çevresinde oluşan inhibisyon zon çapları ölçülerek sonuçlar mm olarak verilmiştir. Sonuçlar NCCLS (The National Committee for Clinical Laboratory, 1999) standartlarına göre değerlendirilmiştir.

#### 3.2.5. Metallere Dirençlilik Deneyleri

Çalışma suşlarının metallere dirençlilik durumları yarım kuvvetli Nutrient agar besiyerinde agar difüzyon metodu ile tespit edilmiştir (Washington et al. 1980). Çalışmada yarım kuvvetli NA besiyerinin kullanılması, içeriğinin yoğun olmamasına bağlı olarak çalışılan metal tuzları ile etkileşime girme olasılığının düşürülmesi

amaçlandığı için tercih edilmiştir. Metal tuzlarının ( $\text{AgNO}_3$ ,  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ ,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{HgCl}_2$ ) 0.005; 0.01; 0.05; 0.1; 0.5; 1; 2.5; 5; 10; 20; 40; 80 mmol l<sup>-1</sup>'lik konsantrasyonlarda solüsyonları hazırlanmış ve bu metal konsantrasyonları 0.22µm por çapındaki filtrelerden geçirilerek steril edilmiştir. Besiyerleri bu konsantrasyonlarda metal içerecek şekilde hazırlanmış ve bu petriyerler 37°C'de 30 dk bekletilerek besiyeri yüzeyi kurutulmuştur ve 0.1 ml kültür inoküle edilmiştir. Petriyerler 30°C'de 2 gün inkübe edilmiştir. Suşların üreme göstermediği en düşük metal konsantrasyonu minimum inhibisyon konsantrasyonu olarak tespit edilmiştir.

Çalışılan suşların ağır metal testleri sonunda  $\text{AgNO}_3$ ,  $\text{CoCl}_2$ ,  $\text{CuSO}_4$ ,  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ ,  $\text{ZnSO}_4$ ,  $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ ,  $\text{NiCl}_2$  ağır metalleri için 1 mmol l<sup>-1</sup>'lik ve daha yüksek konsantrasyonlarında,  $\text{HgCl}_2$  için ise 0.1 mmol l<sup>-1</sup>'lik ve daha yüksek konsantrasyonlarında inhibe olmayanları bu metallere karşı dirençli olarak göz önüne alınmıştır (Nieto, J.J. et al. 1989; Uğur, A. and Ceylan, Ö. 2003).

### 3.2.6. Plazmid Profillerinin Belirlenmesi

Tüm bakterilerin plazmid profilleri modifiye edilmiş hot alkali lizis (Foght, J.M. et al. 1996) plazmid ekstraksiyon yöntemiyle saptanmıştır (Kieser, T. 1984). Bu yöntemde kullanılan çözeltiler şunlardır.

#### 1. Eritme tamponu

0.3 M sukroz

25 mM Tris

25 mM Sodyum EDTA

pH 8'e ayarlanır ve tampon steril edilir.

#### 2. Eritme solüsyonu

0.3 N NaOH

% 2 SDS

Hazırlandıktan sonra bir hafta içinde kullanılmalıdır.

**3. Potasyum asetat solüsyonu**

5 M potasyum asetat	60 ml
Glasiyal asetik asit	11.5 ml
Distile su	28.5 ml

pH'ı 4.8'e ayarlanır ve filtreden geçirilerek steril edilir. 4°C'de saklanır.

**4. Fenol-kloroform karışımı**

Fenol kristalleri	5 g
Kloroform	5 ml
8-hydroxy-quinoline	5 mg
Distile su	1 ml

**5. TAE tamponu**

40 mM Tris
20 mM Sodyum asetat
2 mM EDTA
Distile su (1000 ml)

pH glsiyal asetik asit kullanılarak 8.1'e ayarlanır. Kullanım için stok çözelti 10 kere sulandırılır.

**6. Agaroz****7. Jel yükleme çözeltisi**

% 0.05 bromfenol mavisi
% 40 sukroz
0.1 M EDTA (pH : 8.0)
% 0.5 SDS

**8. Ethidium Bromide çözeltisi**

Ethidium Bromide	100 mg
Distile su	10 ml

Bu hazırlanan sıvı ve çözeltilerle aşağıdaki yöntemle göre plazmid profilleri saptandı.

### 3.2.6.1. Plazmid Profillerini Belirleme Yöntemi

1. Test edilecek bakteri 5 ml nutrient broth içinde bir gece 30°C'de üretilir.
2. Kültürlerden 1.5 ml alınarak ependorf tüplerine aktarılır. Tüpler 13.500 rpm'de 2 dk çevrilir, üstteki sıvı tümüyle dökülür.
3. Bakteri çözeltisi üzerine 500 µl eritme tamponu ilave edilir, karışım iyice süspansedilir. Oda ısısında (yaklaşık 22°C) 5 dk bekletilir.
4. Bu karışımın üzerine 250 µl eritme solüsyonu ilave edilir ve iyice karıştırılarak viskoz bir yapı haline gelmesi beklenir. Eğer karışım tam homojen olmayıp viskoz bir hale gelmediyse, işleme daha az pellet ile yeniden başlanmalıdır.
5. Tüpler 55°C'lik su banyosunda 20 dk tutulur.
6. Tüplerin oda ısısına gelmesi beklendikten sonra 500 µl potasyum asetat solüsyonu eklenir. Önce elle sonra vorteks kullanılarak karıştırılır. 10 dk buzda bekletildikten sonra 13500 rpm'de 3 dk santrifüj edilir.
7. Süpernatant yeni bir tüpe alınır. 250 µl fenol-kloroform eklenir ve 30 saniye vortekslenerek iyice karıştırılır. 13500 rpm'de 3 dk oda ısısında santrifüjlenir.
8. En üst faz yeni bir ependorf tüpüne alınır. Alt ve arafaz atılır. Arafazdan diğer tüpe almamak için dikkatli olmalıdır.
9. 250 µl kloroform eklenir ve iyice karışması sağlanır.
10. 13500 rpm'de 2 dk santrifüjlenir ve üst faz hacmi ölçülerek yeni bir ependorf tüpüne alınır.
11. 0.1 hacim 3 M sodyum asetat (pH : 7.0) eklenir ve karıştırılır.
12. 2 hacim % 95'lik alkol (-20°C'de) eklenir ve karıştırılır.
13. -20°C'de bir gece ya da -70°C'de 30 dk bekletilerek DNA çöktürülür.
14. 13500rpm'de 15 dk, 4°C'de santrifüjlenir. Pelletin yerinin belirlenmesi için tüm ependorflar aynı şekilde yerleştirilir. Süpernatant dikkatlice dökülür.
15. Pellet %70'lik alkol (-20°C'de) ile iyice çalkalanır. 13500 rpm'de 5 dk, 4°C'de santrifüjlenir. Sıvı kısım dikkatlice dökülerek pellet kısmı alınır.



16. Hava akımı olan bir ortamda geri kalan etanolün uçması ve pelletin kuruması sağlanır.

17. Kuruyan pelletin üzerine 25-50µl 10mM Tris, 1mM Sodyum EDTA karışımı eklenerek pellet çözülür. 10 µl yükleme çözeltisi ile karıştırılarak her defasında 2-3 jel yürütmeye yetecek kadar materyal sağlanmış olur.

18. Karışım önceden hazırlanmış ve ethidium bromide (0.5µg/ml) eklenmiş %0.7'lik agaroz jeldeki çukurlara pipet ile konur.

19. 1XTAE içindeki jelde 90 volt, 50 mAmper akımda 3-4 saat yürütülür.

20. Yürütme sonunda jel, UV. transilluminatör (model LMS-203, UVP, Inc., Upland, CA, USA) üzerine konularak plazmid bantları görülür ve Polaroid MP4 fotoğraf makinesi ile ethidium bromide filtresi kullanılarak, 667 tip polaroid filmler ile fotoğraflanır.

### 3.2.6.2. Plazmidlerin Büyüklüklerinin Saptanması

Çalışılan suşlardan izole edilen plazmidlerin büyüklüklerinin saptanmasında, moleküler büyüklükleri bilinen cccDNA marker'larının elektroforetik hareketlilikleri ile, büyüklüklerinin logaritmaları arasında belirlenen doğrusal ilişkiyi yararlanılmıştır. Marker ccc DNA moleküllerinin agaroz jel fotoğrafları üzerinde ölçülen göç aralıkları ile bilinen büyüklüklerinin logaritmik değerlerine bağlı olarak kurveleri çıkarılmış, istatistik analizlerle her farklı jel için korelasyon katsayısı ve kurvenin eğimi belirlenerek, bakterilerden izole edilen plazmidlerin büyüklükleri saptanmıştır.

Her jelde ters logaritmik oranlardan plazmidlerin büyüklüklerinin hesaplanabilmesi için referans plazmid olarak DNA loader supercoiled (SIGMA D-5292) kullanılmıştır. Bu markerda bulunan plazmid DNA'ların moleküler ağırlıkları (kb olarak) şunlardır ; 16.210, 14.174, 12.138, 10.102, 8.066, 7.045, 6.030, 5.012, 3.990, 2.972, 2.067.

$$\text{Kurvenin eğimi (I)} = E - (G.C) / B - (G.A)$$

$$\text{Korelasyon katsayısı (J)} = E - (G.C) / \sqrt{[D - (H.C)].[B - (G.A)]}$$

$$\text{Moleküler Büyüklük (W)} = \text{Antilog}_{10}[I.(\alpha - G) + H]$$

X = Marker DNA moleküllerinin agaroz jel üzerindeki göç aralığı (mm).

Y = Marker DNA moleküllerinin büyüklüğü (kilobaz).

$$A = X_1 + X_2 + X_3 \dots\dots\dots X_n$$

$$B = X_1^2 + X_2^2 + X_3^2 \dots\dots\dots X_n^2$$

$$C = \log_{10}y_1 + \log_{10}y_2 + \log_{10}y_3 \dots\dots\dots + \log_{10}y_n$$

$$D = (\log_{10}y_1)^2 + (\log_{10}y_2)^2 + (\log_{10}y_3)^2 \dots\dots\dots + (\log_{10}y_n)^2$$

$$E = X_1. (\log_{10}y_1) + X_2. (\log_{10}y_2) + X_3. (\log_{10}y_3) \dots\dots\dots + X_n(\log_{10}y_n)$$

$$G = \text{Ortalama X} = A/N$$

$$H = \text{Ortalama Y} = C/N$$

$\alpha$  = Moleküler büyüklüğü bilinmeyen plazmidin jel üzerindeki göçü (mm).

### 3.2.7. Proteinlerin Moleküler Ağırlıklarının Belirlenmesi

Çalışmada kullanılan suşların toplam hücre proteinlerinin izolasyonu Pot ve ark. metoduna göre elde edilmiş olup (Pot, B. et al. 1994), proteinlerin moleküler ağırlıklarına göre ayırımı Sodyum dodesil sülfat- Poliakrilamid jel elektroforez (SDS-PAGE) tekniği ile Laemmli'ye göre yapılmıştır (Laemmli, U.K. 1970). Bu teknikte kullanılan tamponlar ve hazırlanışları aşağıda verilmiştir.

#### 1. Resolving jel (Ayrıcı Jel) (%10'luk)

Acryl-Bisacryl (%30).....	11.56 ml
dd.su.....	14.26 ml
1.5M Tris.HCl.(pH : 8.6).....	8.66 ml
Amonyum persulfat (APS) % 10'luk .....	173.4 µl

TEMED..... 16  $\mu$ l

## 2. Stacking Jel (Yığıma Jel) (% 4'lük)

Acryl-Bisacryl (% 30).....1.64 ml

dd.su.....5.86 ml

0.5M Tris.HCl.(pH : 6.8)..... 2.5 ml

Amonyum persulfat (APS) % 10'luk ..... 60  $\mu$ l

TEMED..... 10  $\mu$ l

## 3. Running buffer (Koşurma Tamponu)

Trizma-base.....1.21 g

Glisin.....5.76 g

SDS.....1.0 g

Saf su.....1000 ml

## 4. Sample Buffer (Örnek Tamponu) (pH : 6.8)

0.062 M Tris-HCl.....0.75 g

2-merkapt etanol.....5 ml

Gliserol.....10 ml

Brom fenol mavisi (kristal) .....1 mg

Saf su .....100 ml.

## 5. Staining Solution (Boyama Solüsyonu)

Coomassie Brilliant Blue R 250 ..... 1.5 g

İzopropil alkol .....250 ml

Asetik asit .....100 ml

Saf su .....650 ml

## 6. Destaining Solution (Boya Çıkarıcı Solüsyon)

İzopropil alkol .....	250 ml
Asetik asit .....	100 ml
Saf su .....	650 ml

### 3.2.7.1. Total Hücre Proteinlerinin İzolasyonu

1. Çalışılan suşlar inkübasyon süresini tamamladıktan sonra 5000 rpm'de 15 dk santrifüj edilir ve süpernatant kısmı uzaklaştırılır.
2. Elde edilen pellet % 0.8 sodyum klorür içeren sodyum fosfat buffer (0.01 M, pH 7.3) ile 2-3 kez yıkanır. Mukus üreten suşlar daha fazla miktarda sodyum fosfat buffer ile süspanse edilerek (20 ml buffer, 100 mg yaş hücre gibi) polisakkarit türevi yapılar uzaklaştırılır.
3. Yıkama işlemi 5000 rpm'de 10 dk santrifüj edilerek gerçekleştirilir. Pelletin üzerine son olarak sodyum fosfat buffer eklenir ve buzlu ortamda 45 sn sonikasyon işlemine tabi tutulur. Burada sonikasyon işleminin amacı yüksek ses titreşimi ile bakteri hücre duvarının parçalanmasıdır. Buzlu ortam ise ısınmayı engellemek için kullanılmaktadır. Bu aşamadaki ısınma hücre proteinlerinin yapısını bozacaktır. Tekrar 5000 rpm'de 10 dk santrifüj edilir ve süpernatant uzaklaştırılır. Böylece pellet yıkanmış ve besiyeri kalıntılarından arındırılmış olur.
4. Pellet üzerine 0.9 ml sample buffer (örnek tamponu) eklenir ve vorteksle süspanسیونun iyice karışması sağlanır. Protein örnekleri 1.5 ml'lik konik uçlu ependorf tüplerine alınmıştır.
5. Süspanسیونun üzerine 0.1 ml % 20 SDS çözeltisi eklenir ve karışması sağlanır.
6. Hücre süspanسیونu 95-100°C sıcaklıktaki kaynar suda 10 dakika bekletilir.
7. Süspanسیون 10.000xg'de 10 dakika santrifüj edilir. Süpernatant yükleme işlemine kadar -20°C'de saklanır.

8. Elde edilen protein örnekleri %10'luk SDS-PAGE'de koşturulmuştur. Yükleme haricinde geri kalan örnekler - 20°C'de saklanmıştır.

9. Protein örnekleri ile birlikte her jelde 116.0, 66.2, 45.0, 35.0, 25.0, 18.4, 14.4 kDa moleküler ağırlığına sahip 7 saf protein bandı içeren protein moleküler ağırlık markerı (MBI Fermentas, SM 0439) yüklenmiş ve elde etmiş olduğumuz protein örnekleri ile birlikte koşturulmuştur.

### 3.2.7.2. Jel Elektroforezin Yapılışı

1. Aparatın camları (0.75mm x 16cm x 21cm) alkolle iyice temizlenip kurulandıktan sonra spacer yerleştirilir. İşlem sonunda spacer, 2 cam arasında kalır ve arada boşluk oluşmasını sağlar.

2. Aparat hazırlandıktan sonra önceden hazırlanmış olan % 10'luk ayrıcı jel (resolving jel) iki cam arasına dökülür. Burada jelin hava ile temasını kesmek için üzeri tamamen saf su ile doldurulur. Jelin polimerize olması için yaklaşık 30 dk beklenir.

3. Resolving jel polimerize olduktan sonra üzerindeki saf su boşaltılır ve bunun yerine % 4'lük yığıma jel (Stacking jel) ilave edilir. Bu işlemden sonra yığıma jel içerisine plastik tarak yerleştirilerek örnek proteinlerin yükleneceği çukurluklar hazırlanır.

4. Jel polimerize olduktan sonra taraklar çıkarılır ve çukurlukların içi koşturma tamponu (Running buffer) ile yıkanır.

5. Elektroforez tankının içide running buffer ile doldurulur ve hazırlanan protein örnekleri jel çukurluklarına yüklenir. Tüm bu işlemler esnasında jellerin içinde ve arasında hava kabarcıklarının olmamasına dikkat edilir.

6. Yüklennmiş örnekler 100 Volt , 25 miliamperde elektroforeze tabi tutulur. Daha sonra izleme boyasına bakılarak jelin altında 1.5 cm mesafe kalınca elektroforez durdurulur.

7. Elektroforezden sonra jel camların arasından dikkatlice çıkarılarak boyama solüsyonunda (Staining solution) bir gece bekletilir.

8. Ertesi gün boya çıkarıcı solüsyona (Destaining solution) alınır. Bu solüsyonda da bir gece bekletilir. Bu işlemlerle jelin boyasının çıkarılarak protein bantlarının görünür hale gelmesi sağlanır. Protein bantları tamamen görünür hale gelince jelin fotoğrafı çekilir ve oluşan bantlar marker bantları veya birbirleriyle karşılaştırılır. Böylece bantlar arasındaki benzerlikler ve farklılıklar tespit edilir.



#### 4. BULGULAR

Muğla İli sınırlarında bulunan Yuvarlakçay'dan yakalanan yılan balığı (*Anguilla anguilla* L., 1758) örneklerinin derilerinden izole edilmiş ve önidentifikasyon testleri yapılarak Muğla Üniversitesi Kültür Koleksiyonuna alınmış 40 adet non-fermentatif Gram negatif bakteri çalışmaya alınmıştır.

Bu bakterilerin koloni morfolojileri incelenerek, pigment üretimi, oksidaz, katalaz ve DNase testleri yapılmıştır (Tablo 6). Bu bakterilerin diğer biyokimyasal testleri API 20NE test kitleri ile yapılmış ve bu testlerin sonucunda çalışmaya alınan 40 bakterinin 28 adedinin *Pseudomonas* ve *Pseudomonas* genusu ile ilişkili genoslara ait olduğu tespit edilmiştir. Çalışma bu aşamadan itibaren 28 bakteri ile devam etmiştir. Bu bakterilere uygulanan API 20 NE test kitleri ile yapılan identifikasyon sonuçları Tablo 7'de, API ZYM enzim testlerinin sonuçları ise Tablo 8'de verilmiştir.

Çalışmaya alınan suşların, NCCLS standartları gözönüne alınarak seçilmiş olan çeşitli antibiyotiklere duyarlılıkları incelenmiş, bulunan inhibisyon zon çapları Tablo 9 ve Tablo 10'da verilmiştir. Bu inhibisyon zon çaplarına göre suşların antibiyotiklere olan duyarlılık ve dirençlilik durumları, NCCLS standartlarına göre değerlendirilmiş ve Tablo 11 ve Tablo 12'de verilmiştir (NCCLS, M100-S9, 1999).

Suşların ağır metallere dirençlilik düzeyleri ise minimum inhibisyon konsantrasyonları (MİK) şeklinde Tablo 13'de verilmiştir. Bu konsantrasyonlara bağlı olarak direnç durumları Tablo 14'de gösterilmiştir.

Çalışılan suşların plazmid profilleri Foght ve ark. tarafından modifiye edilmiş Kieser, T (1984)'in metodu ile çıkarılmıştır. Suşların taşıdığı plazmid sayısı ve plazmidlerin moleküler ağırlıkları Tablo 15'de verilmiştir.

Tablo 6. Çalışılan Suşların Koloni Morfolojisi ve Bazı Fizyolojik Özellikleri

Suş No	Koloni çapı	Koloni tipi	Pigment üretimi	Oksidaz	Katalaz	DNase
MU 18	3-4 mm	S tip	-	-	+	+
MU 23	2-3 mm	S tip	-	-	+	+
MU 25	1 mm	S tip	-	+	+	+
MU 52	2-3 mm	S tip	-	+	+	+
MU 53	2-3 mm	S tip	-	+	+	+
MU 56	2-3 mm	S tip	-	-	+	+
MU 58	2-3 mm	R tip	-	-	+	+
MU 63	2-3 mm	S tip	-	+	+	+
MU 64	1-2 mm	S tip	-	+	+	+
MU 65	2-3 mm	S tip	-	+	+	W
MU 66	1-2 mm	S tip	-	+	+	W
MU 67	1-2 mm	S tip	+	+	+	-
MU 69	2-3 mm	S tip	-	-	+	+
MU 70	3-4 mm	R tip	-	+	+	-
MU 73	1-2 mm	S tip	-	+	+	W
MU 75	2-3 mm	S tip	-	+	+	W
MU 83	4-5 mm	S tip	-	+	+	W
MU 87	3-4 mm	S tip	-	+	+	+
MU 94	1-2 mm	S tip	-	+	+	+
MU 96	1 mm	S tip	-	-	+	+
MU 97	2-3 mm	S tip	-	+	+	+
MU 99	2-3 mm	S tip	-	+	+	+
MU 136	1-2 mm	S tip	-	+	+	W
MU 137	1-2 mm	S tip	-	-	+	+
MU 139	3-4 mm	R tip	-	+	+	+
MU 140	1-2 mm	S tip	+	+	+	-
MU 141	1-2 mm	S tip	+	+	+	-
MU 145	1-2 mm	S tip	+	+	+	-

(-) : Negatif reaksiyon

(+) : Pozitif reaksiyon

(w): Zayıf reaksiyon



Tablo 7. API 20 NE İdentifikasyon Kitleriyle Yapılan Biyokimyasal Testlerin Sonuçları

Suş no	N O <sub>3</sub>	T R P	G L U	A D H	U R E	E S C	G E L	P N G	G L U	A R A	M N E	M A N	N A G	M A L	G N T	C A P	A D I	M L T	C I T	P A C	O X
MU 66	+	-	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+
MU 75	+	-	-	+	-	-	+	-	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+
MU 87	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
MU 97	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
MU 73	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+
MU 83	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+
MU 139	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+
MU 70	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+
MU 18	+	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-
MU 56	+	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-
MU 58	+	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-
MU 65	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+
MU 96	+	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-
MU 23	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	-
MU 25	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-	+
MU 52	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-	+
MU 53	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-	+
MU 63	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-	+
MU 64	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-	+
MU 69	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-
MU 94	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+
MU 99	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+
MU 136	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-	+
MU 137	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	-
MU 67	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+
MU 145	+	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+
MU 140	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+
MU 141	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+

(-) : Negatif reaksiyon

(+) : Pozitif reaksiyon

NO<sub>3</sub> : Potasyum nitrat, TRP : Triptofan, GLU : Glukozdan asit üretimi, ADH : Arginin, URE : Üre, ESC : Eskülin, GEL : Jelatin, PNPG : p-nitrofenil-β-D-galaktopiranosit, GLU : Glukoz kullanımı, ARA : Arabinoz, MNE : Mannoz, MAN : Mannitol, NAG : N-asetil glukozamin, MAL : Maltoz, GNT : Glukonat, CAP : Kaprat, ADI : Adipat, MLT : Malat, CIT : Sitrat, PAC : Fenil asetat, OX : Oksidaz.

Tablo 8. API ZYM Enzim Testi Sonuçları

Sus No	1 Kontrol	2 Alkaline phosphatase	3 Esterase(C4)	4 Esterase Lipase (C8)	5 Lipase (C 14)	6 Leucine arylamidase	7 Valine arylamidase	8 Cystine arylamidase	9 Trypsin	10 $\alpha$ -chymotrypsin	11 Acid phosphotase	12 Naftol fosfotidrolaz	13 $\alpha$ -galactosidase	14 $\beta$ -galactosidase	15 $\beta$ -glucuronidase	16 $\alpha$ -glucosidase	17 $\beta$ -glucosidase	18 N-asetil- $\beta$ glukozaz	19 $\alpha$ -mannosidase	20 $\alpha$ -fucosidase
MU 66	N	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
MU 75	N	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
MU 87	N	-	+	-	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MU 97	N	-	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
MU 73	N	-	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
MU 83	N	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
MU 139	N	-	+	-	-	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
MU 70	N	+	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MU 18	N	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-
MU 56	N	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	-	+	-	-
MU 58	N	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	-	+	-	-
MU 65	N	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-
MU 96	N	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-
MU 23	N	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-
MU 25	N	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-
MU 52	N	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-
MU 53	N	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-
MU 63	N	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-
MU 64	N	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-
MU 69	N	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-
MU 94	N	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-
MU 99	N	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-
MU 136	N	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-
MU 137	N	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-
MU 67	N	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-	+	-	+	-	+	-	-
MU 145	N	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-
MU 140	N	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
MU 141	N	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-

N : Normal

(+) : Pozitif sonuç

(-) : Negatif sonuç

Tablo 9. Suşların Bazı Antibiyotiklere Karşı Gösterdikleri İnhibisyon Zon Çapları

Suş No	İnhibisyon Zon Çapları (mm)										
	MEZ	PRL	TIM	CAZ	FEP	CRO	CTX	KF	IPM	ATM	P
MU 66	8	25	-	-	15	-	-	-	13	12	-
MU 75	10	28	-	-	12	-	-	-	14	12	-
MU 87	13	-	-	22	25	9	-	-	29	14	-
MU 97	15	12	-	18	18	10	-	-	22	-	-
MU 73	15	-	10	17	15	9	-	-	16	15	-
MU 83	15	18	-	13	20	7	29	-	22	-	-
MU 139	15	10	12	17	16	9	-	-	25	16	-
MU 70	11	16	26	-	9	18	9	-	37	-	-
MU 18	10	10	19	20	23	14	13	-	17	12	-
MU 56	11	12	18	-	14	13	10	-	-	14	-
MU 58	12	12	19	-	14	14	12	-	-	14	-
MU 65	11	13	-	10	14	9	-	-	40	12	-
MU 96	12	-	20	22	27	14	10	-	18	17	-
MU 23	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MU 25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MU 52	-	-	9	-	9	-	-	-	-	-	-
MU 53	11	13	-	10	14	9	-	-	40	9	-
MU 63	-	-	-	-	9	-	-	-	-	-	-
MU 64	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MU 69	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MU 94	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MU 99	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MU 136	-	-	-	-	11	-	-	-	-	-	-
MU 137	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MU 67	30	11	21	19	20	NT	-	20	35	13	15
MU 145	30	20	26	23	21	NT	15	22	38	17	17
MU 140	32	NT	NT	12	NT	NT	NT	NT	54	-	NT
MU 141	30	NT	NT	10	NT	NT	NT	NT	50	-	NT

MEZ : Mezlosilin (75 mcg), PRL : Piperasillin (100 mcg), TIM : Tikarsilin+klavulanik asit (75+10 mcg), CAZ : Seftazidim (30 mcg), FEP : Sefepim (30 mcg), CRO : Seftriakson (30 mcg), CTX : Sefotaksim (30 mcg), KF : Sefalotin (30 mcg), IPM : İmipenem (10 mcg), ATM : Aztreonam (30 mcg), P : Penisilin (10 U).

NT : Denenmedi.

Tablo 10. Suşların Bazı Antibiyotiklere Karşı Gösterdikleri İnhibisyon Zon Çapları

Suş No	İnhibisyon Zon Çapları (mm)										
	AK	TOB	NET	CN	TE	CIP	NOR	C	SXT	TVA	AM
MU 66	19	25	29	24	20	38	33	8	11	NT	-
MU 75	25	27	31	23	20	35	34	15	13	NT	-
MU 87	22	23	25	18	22	25	31	-	-	NT	-
MU 97	20	21	24	18	16	20	25	-	-	NT	-
MU 73	20	21	19	17	16	18	23	-	-	NT	-
MU 83	17	16	21	18	13	21	30	9	-	NT	9
MU 139	20	22	18	16	16	20	22	-	-	NT	-
MU 70	22	20	29	20	20	25	26	-	14	NT	-
MU 18	14	15	15	14	14	16	20	17	21	NT	-
MU 56	11	15	19	11	16	15	18	18	24	NT	-
MU 58	11	16	19	12	15	15	18	17	23	NT	-
MU 65	17	18	20	15	25	20	15	14	24	NT	-
MU 96	14	15	17	13	8	20	22	16	-	NT	9
MU 23	-	-	-	-	9	21	15	13	19	23	-
MU 25	-	-	-	-	10	20	12	14	25	23	-
MU 52	-	-	-	-	11	20	13	13	24	24	-
MU 53	17	18	20	15	25	20	15	14	24	18	-
MU 63	-	-	-	-	11	20	13	13	30	23	-
MU 64	-	-	-	-	9	20	14	12	14	20	-
MU 69	-	-	-	-	-	21	13	13	15	22	-
MU 94	-	-	8	-	13	22	10	11	31	25	-
MU 99	-	-	-	-	11	25	9	11	14	29	-
MU 136	10	11	13	-	15	23	15	16	28	29	-
MU 137	-	-	-	-	11	20	13	12	25	25	-
MU 67	-	-	-	-	10	9	21	20	-	NT	15
MU 145	23	22	25	22	13	11	-	28	-	NT	19
MU 140	NT	NT	NT	30	35	34	NT	9	32	NT	23
MU 141	NT	NT	NT	35	38	40	NT	NT	35	NT	30

AK : Amikasin (30 mcg), TOB : Tobramisin (10 mcg), NET : Netilmisin (30 mcg),

CN : Gentamisin (10 mcg), TE : Tetrasiklin (30 mcg), CIP : Siprofloksasin (5 mcg),

NOR : Norfloksasin (10 mcg), C : Kloramfenikol (30 mcg), SXT : Trimetoprim+sulfametaksazol

(1.25+23.75 mcg), TVA : Trovafloksasin (10 mcg), AM : Ampisillin (10 mcg).

NT : Denenmedi.

Tablo 11. Suşların Standart İnhibisyon Zon Çaplarına Göre Antibiyotiklere Olan Dirençlilik ve Duyarlılıkları

Suş No	MEZ	PRL	TIM	CAZ	FEP	CRO	CTX	KF	IPM	ATM	P
MU 66	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R
MU 75	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R
MU 87	R	R	R	S	S	R	R	R	S	R	R
MU 97	R	R	R	S	S	R	R	R	S	R	R
MU 73	R	R	R	S	R	R	R	R	S	R	R
MU 83	R	S	R	R	S	R	S	R	S	R	R
MU 139	R	R	R	S	R	R	R	R	S	R	R
MU 70	R	S	S	R	R	R	R	R	S	R	R
MU 18	R	R	S	S	S	R	R	R	S	R	R
MU 56	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R
MU 58	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R
MU 65	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R
MU 96	R	R	S	S	S	R	R	R	S	R	R
MU 23	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
MU 25	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
MU 52	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
MU 53	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R
MU 63	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
MU 64	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
MU 69	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
MU 94	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
MU 99	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
MU 136	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
MU 137	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
MU 67	S	R	S	S	S	NT	R	S	S	R	R
MU 145	S	S	S	S	S	NT	R	S	S	R	R
MU 140	S	NT	NT	R	NT	NT	NT	NT	S	R	NT
MU 141	S	NT	NT	R	NT	NT	NT	NT	S	R	NT

MEZ : Mezlosilin (75 mcg), PRL : Piperasillin (100 mcg), TIM : Tikarsilin+klavulanik asit (75+10 mcg), CAZ : Seftazidim (30 mcg), FEP : Sefepim (30 mcg), CRO : Seftriakson (30 mcg), CTX : Sefotaksim (30 mcg), KF : Sefalotin (30 mcg), IPM : İmipenem (10 mcg), ATM : Aztreonam (30 mcg), P : Penisilin (10 U).

R : Dirençli, S : Duyarlı, NT : Denenmedi.

Tablo 12. Suşların Standart İnhibisyon Zon Çaplarına Göre Antibiyotiklere Olan Dirençlilik ve Duyarlılıkları

Suş No	AK	TOB	NET	CN	TE	CIP	NOR	C	SXT	TVA	AM
MU 66	S	S	S	S	S	S	S	R	R	NT	R
MU 75	S	S	S	S	S	S	S	R	R	NT	R
MU 87	S	S	S	S	S	S	S	R	R	NT	R
MU 97	S	S	S	S	R	R	S	R	R	NT	R
MU 73	S	S	S	S	R	R	S	R	R	NT	R
MU 83	S	S	S	S	R	S	S	R	R	NT	R
MU 139	S	S	S	S	R	R	S	R	R	NT	R
MU 70	S	S	S	S	S	S	S	R	R	NT	R
MU 18	R	S	S	S	R	R	S	R	S	NT	R
MU 56	R	S	S	R	R	R	S	S	S	NT	R
MU 58	R	S	S	R	R	R	S	R	S	NT	R
MU 65	S	S	S	S	S	R	R	R	S	NT	R
MU 96	R	S	S	R	R	R	S	R	R	NT	R
MU 23	R	R	R	R	R	S	R	R	S	R	R
MU 25	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R
MU 52	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R
MU 53	S	S	S	S	S	R	R	R	S	R	R
MU 63	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R
MU 64	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
MU 69	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R
MU 94	R	R	R	R	R	S	R	R	S	R	R
MU 99	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R
MU 136	R	R	R	R	R	S	R	R	S	R	R
MU 137	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R
MU 67	R	R	R	R	R	R	S	S	R	NT	R
MU 145	S	S	S	S	R	R	R	S	R	NT	R
MU 140	NT	NT	NT	S	S	S	NT	R	S	NT	S
MU 141	NT	NT	NT	S	S	S	NT	NT	S	NT	S

AK : Amikasin (30 mcg), TOB : Tobramisin (10 mcg), NET : Netilmisin (30 mcg),

CN : Gentamisin (10 mcg), TE : Tetrasiklin (30 mcg), CIP : Siprofloksasin (5 mcg),

NOR : Norfloksasin (10 mcg), C : Kloramfenikol (30 mcg), SXT : Trimetoprim+sulfametaksazol

(1.25+23.75 mcg), TVA : Trovafloksasin (10 mcg), AM : Ampisillin (10 mcg).

R : Dirençli, S : Duyarlı, NT : Denenmedi.

Tablo 13. Suşların Ağır Metallere Karşı Gösterdikleri Minimum İnhibisyon Konsantrasyonları

Suş No	NiCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	Pb(CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub> ·3H <sub>2</sub> O	CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub>	HgCl <sub>2</sub>	AgNO <sub>3</sub>
	Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu (mmol <sup>-1</sup> )							
MU 66	0.5	1	10	0.05	0.1	0.5	0.005	0.005
MU 75	0.1	1	5	0.05	0.1	0.1	0.005	0.005
MU 87	0.5	5	2.5	0.1	0.5	0.5	0.05	0.05
MU 97	0.5	2.5	2.5	0.1	0.5	0.5	0.05	0.01
MU 73	0.5	20	2.5	0.25	1	0.5	0.01	0.01
MU 83	0.5	20	2.5	0.25	1	0.5	0.01	0.05
MU 139	0.5	5	2.5	0.25	0.25	0.25	0.01	0.1
MU 70	0.5	1	5	0.1	0.5	1	0.005	0.005
MU 18	0.5	10	2.5	0.25	1	0.25	0.01	0.01
MU 56	0.5	20	5	0.1	0.5	0.5	0.01	0.005
MU 58	0.5	20	5	0.1	0.5	0.5	0.01	0.005
MU 65	0.1	10	5	0.1	0.5	0.5	0.005	0.005
MU 96	0.5	20	2.5	0.5	1	0.5	0.05	0.01
MU 23	0.5	10	5	0.1	1	0.5	0.005	0.005
MU 25	1	20	10	0.1	1	0.5	0.01	0.005
MU 52	1	20	5	0.1	1	0.5	0.01	0.05
MU 53	1	20	5	0.1	1	0.5	0.01	0.005
MU 63	1	20	5	0.1	1	0.5	0.01	0.005
MU 64	1	20	10	0.1	1	0.5	0.005	0.005
MU 69	1	20	5	0.1	1	0.5	0.01	0.005
MU 94	0.5	20	2.5	0.25	1	0.5	0.05	0.05
MU 99	0.5	10	2.5	0.5	2.5	0.5	0.05	0.1
MU 136	1	20	5	0.1	1	1	0.01	0.005
MU 137	1	20	5	0.1	1	0.5	0.01	0.005
MU 67	0.5	0.5	0.5	0.1	0.5	0.5	0.005	0.005
MU 145	0.5	10	5	0.1	0.5	0.1	0.005	0.005
MU 140	2.5	20	10	2.5	1	0.25	0.1	1
MU 141	0.5	20	5	2.5	2.5	2.5	0.05	2.5

NiCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O : Nikel klorür, ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O : Çinko sülfat, Pb(CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>·3H<sub>2</sub>O : Kurşun asetat,

CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O : Kobalt klorür, CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O : Bakır sülfat, K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> : Potasyum kromat,

HgCl<sub>2</sub> : Civa klorür, AgNO<sub>3</sub> : Gümüş nitrat.

Tablo 14. Suşların Ağır Metallere Karşı Gösterdikleri Minimum İnhibisyon Konsantrasyonlarına Göre Dirençlilik ve Duyarlılıklarının Durumu

Suş No	NiCl <sub>2</sub> . 6H <sub>2</sub> O	ZnSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	Pb(CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub> . 3H <sub>2</sub> O	CoCl <sub>2</sub> . 6H <sub>2</sub> O	CuSO <sub>4</sub> . 5H <sub>2</sub> O	K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub>	HgCl <sub>2</sub>	AgNO <sub>3</sub>
MU 66	S	R	R	S	S	S	S	S
MU 75	S	R	R	S	S	S	S	S
MU 87	S	R	R	S	S	S	S	S
MU 97	S	R	R	S	S	S	S	S
MU 73	S	R	R	S	R	S	S	S
MU 83	S	R	R	S	R	S	S	S
MU 139	S	R	R	S	S	S	S	S
MU 70	S	R	R	S	S	R	S	S
MU 18	S	R	R	S	R	S	S	S
MU 56	S	R	R	S	S	S	S	S
MU 58	S	R	R	S	S	S	S	S
MU 65	S	R	R	S	S	S	S	S
MU 96	S	R	R	S	R	S	S	S
MU 23	S	R	R	S	R	S	S	S
MU 25	R	R	R	S	R	S	S	S
MU 52	R	R	R	S	R	S	S	S
MU 53	R	R	R	S	R	S	S	S
MU 63	R	R	R	S	R	S	S	S
MU 64	R	R	R	S	R	S	S	S
MU 69	R	R	R	S	R	S	S	S
MU 94	S	R	R	S	R	S	S	S
MU 99	S	R	R	S	R	S	S	S
MU 136	R	R	R	S	R	R	S	S
MU 137	R	R	R	S	R	S	S	S
MU 67	S	R	S	S	S	S	S	S
MU 145	S	R	R	S	S	S	S	S
MU 140	R	R	R	R	R	S	R	R
MU 141	S	R	R	R	R	R	S	R

NiCl<sub>2</sub>. 6H<sub>2</sub>O : Nikel klorür, ZnSO<sub>4</sub>. 7H<sub>2</sub>O : Çinko sülfat, Pb(CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>. 3H<sub>2</sub>O : Kurşun asetat,

CoCl<sub>2</sub>. 6H<sub>2</sub>O : Kobalt klorür, CuSO<sub>4</sub>. 5H<sub>2</sub>O : Bakır sülfat, K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> : Potasyum kromat,

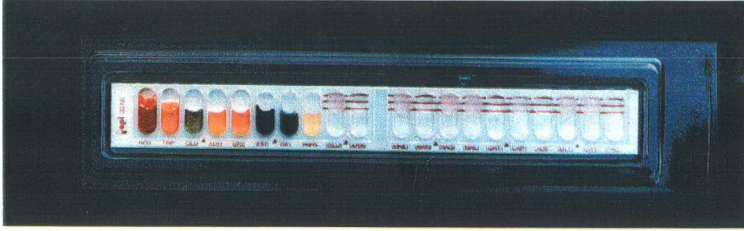
HgCl<sub>2</sub> : Cıva klorür, AgNO<sub>3</sub> : Gümüş nitrat.

R : Dirençli, S: Duyarlı.

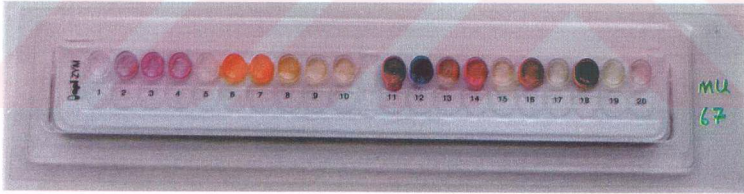


Tablo 15. Çalışılan Suşların Plazmid DNA Profil ve Moleküler Ağırlıkları

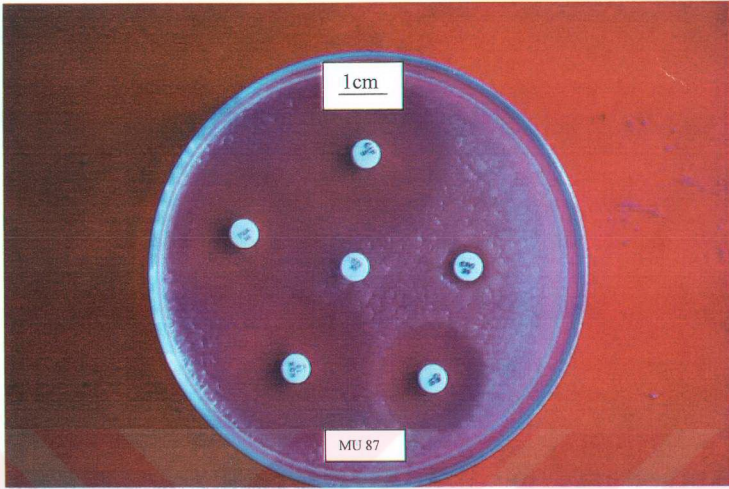
Şuşlar	Plazmid Profilleri	Moleküler Ağırlık (kb)
<i>P.fluorescens</i> (MU 66)	-	-
<i>P.fluorescens</i> (MU 75)	-	-
<i>P.fluorescens</i> (MU 87)	2	21.59, 12.68
<i>P.fluorescens</i> (MU 97)	-	-
<i>P.putida</i> (MU 73)	-	-
<i>P.putida</i> (MU 83)	-	-
<i>P.putida</i> (MU 139)	-	-
<i>P.stutzeri</i> (MU 70)	-	-
<i>C.luteola</i> (MU 18)	-	-
<i>C.luteola</i> (MU 56)	-	-
<i>C.luteola</i> (MU 58)	-	-
<i>C.luteola</i> (MU 65)	-	-
<i>C.luteola</i> (MU 96)	-	-
<i>S.maltophilia</i> (MU 23)	-	-
<i>S.maltophilia</i> (MU 25)	-	-
<i>S.maltophilia</i> (MU 52)	5	13.86, 6.24, 5.71, 2.35, 0.89
<i>S.maltophilia</i> (MU 53)	-	-
<i>S.maltophilia</i> (MU 63)	2	6.24, 2.57
<i>S.maltophilia</i> (MU 64)	-	-
<i>S.maltophilia</i> (MU 69)	1	13.86
<i>S.maltophilia</i> (MU 94)	-	-
<i>S.maltophilia</i> (MU 99)	-	-
<i>S.maltophilia</i> (MU 136)	-	-
<i>S.maltophilia</i> (MU 137)	-	-
<i>S.paucimobilis</i> (MU 67)	-	-
<i>S.paucimobilis</i> (MU 145)	-	-
<i>M.mesophilicum</i> (MU 140)	-	-
<i>M.mesophilicum</i> (MU 141)	2	21.59, 11.61



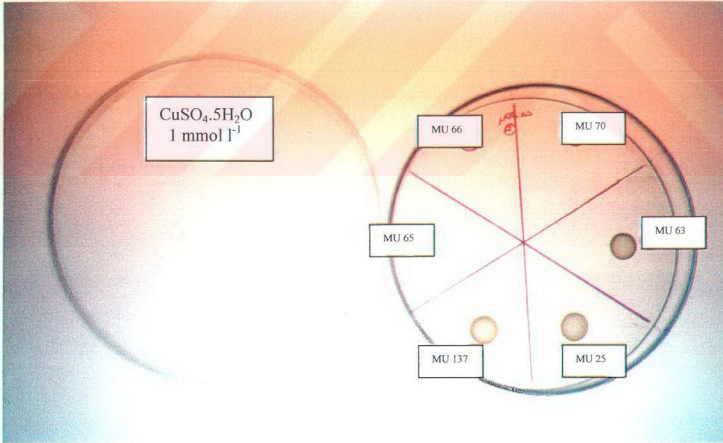
Şekil 1. *S. maltophilia* MU 23 şuşunun API 20 NE striplerindeki reaksiyonları.



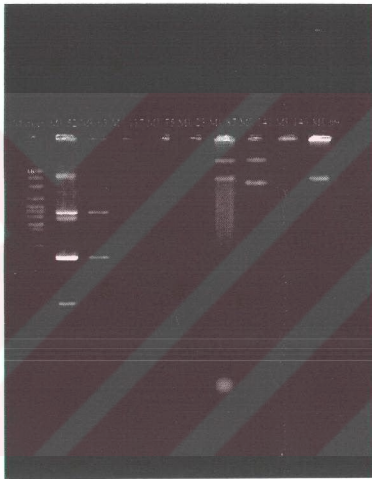
Şekil 2. *S. paucimobilis* MU 67 şuşunun API ZYM enzim kitlerindeki reaksiyonları.



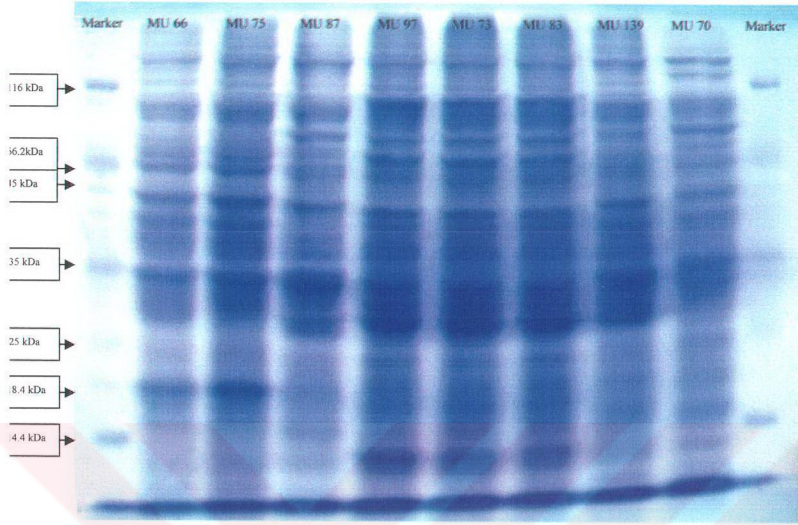
Şekil 3. Siprofloksasin, seftriakson, sefotaksim, gentamisin, norfloksasin, trovafloksasin antibiyotiklerinin *P. fluorescens* MU 87 suşu üzerinde oluşturdukları inhibisyon zonları.



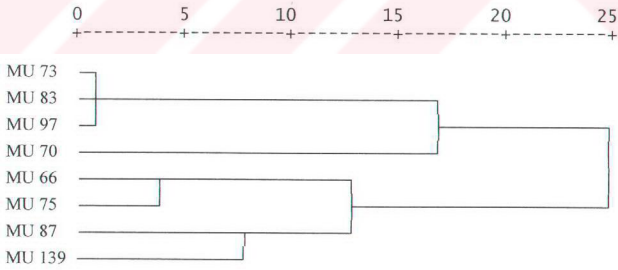
Şekil 4. 1 mmol l<sup>-1</sup> konsantrasyonda CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O içeren besiyerinde *P. stutzeri* MU 70, *P. fluorescens* MU 66, *C. luteola* MU 65, *S. maltophilia* MU 25, MU 63, MU 137 suşlarının üreme durumları.



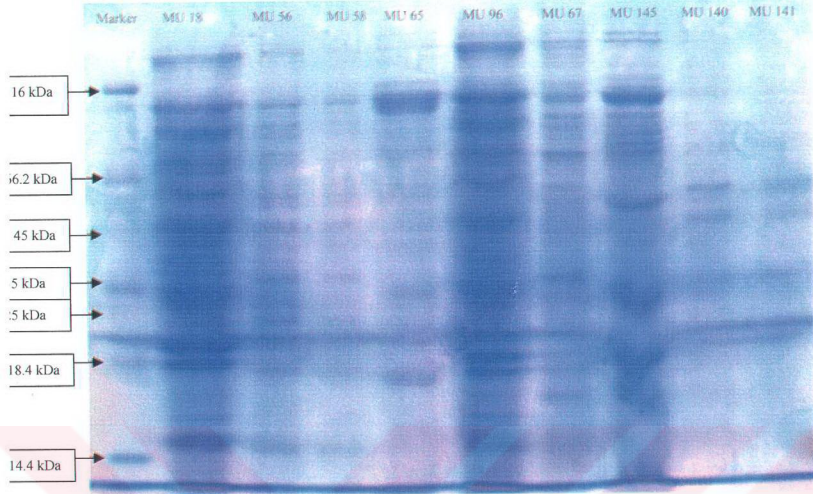
Şekil 5. *P.fluorescens* MU 75, MU 87, *S.maltophilia* MU 23, MU 52, MU 63, MU 69, MU 137 ve *M.mesophilicum* MU 140, MU 141 suşlarının plazmid DNA profilleri.



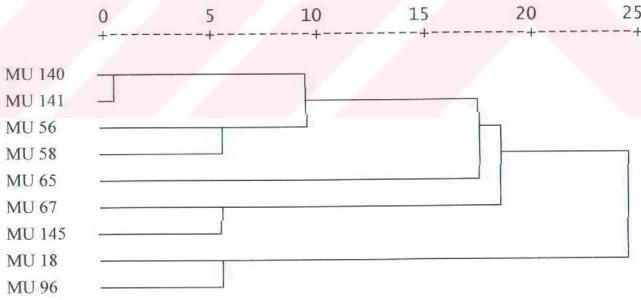
Şekil 6. *Pseudomonas* genusuna ait türlerin toplam hücre protein profilleri (SDS-PAGE).



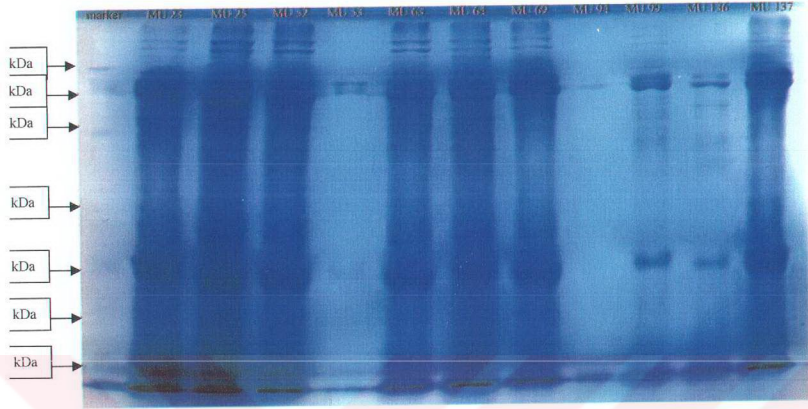
Şekil 7. *Pseudomonas* genusuna ait türlerin toplam hücre protein profillerine ait dendrogram.



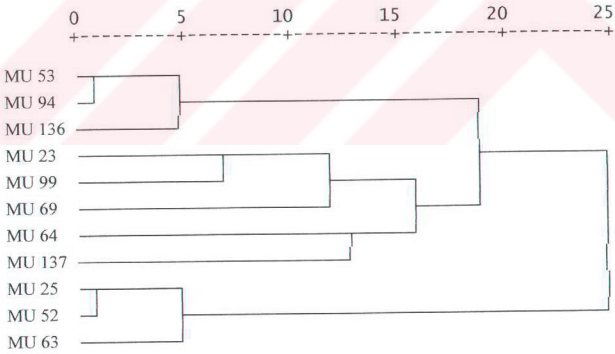
Şekil 8. *C. luteola*, *S. paucimobilis* ve *M. mesophilicum* suşlarının toplam hücre protein profilleri (SDS-PAGE)



Şekil 9. *C. luteola*, *S. paucimobilis* ve *M. mesophilicum* suşlarının toplam hücre protein profillerine ait dendrogram.



Şekil 10. *S. maltophilia* suşlarının toplam hücre protein profilleri (SDS-PAGE)



Şekil 11. *S. maltophilia* suşlarının toplam hücre protein profillerine ait dendrogram.

## 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Çalışmaya alınan 40 adet non-fermentatif gram negatif bakterinin koloni morfolojisi incelenmiş, pigment üretimi, oksidaz, katalaz ve DNase testleri klasik yöntemlerle yapılmış, diğer biyokimyasal özellikleri ise API 20NE identifikasyon kitleri ile tespit edilmiştir. Bu testlerin sonucunda bu bakterilerin 20 adedinin *Pseudomonas* generusu ile ilişkili genoslara ait olduğu, 8 adedinin ise *Pseudomonas* generusuna ait olduğu tespit edilmiştir. Çalışma bu aşamadan itibaren toplam 28 adet bakteri ile devam etmiştir. Bu bakterilerin tür düzeyinde dağılımları, 11 adet *S. maltophilia*, 5 adet *C. luteola*, 2 adet *S. paucimobilis* ve 2 adet *M. mesophilicum*, 4 adet *P. fluorescens*, 3 adet *P. putida* ve 1 adet *P. stutzeri* şeklindedir (Tablo 2).

API 20 NE test sonuçlarına genel olarak bakıldığında triptofan testi sonuçlarına göre tüm suşların triptofandan indol üretmediği tespit edilmiştir. Bütün suşlar içerisinde *C.luteola* suşları dışındaki suşların glukozdan asit üretmedikleri görülmüştür. *C.luteola* suşları içerisinde ise 4 suş glukozdan asit üretirken bir suş (MU 65) asit üretmemiştir. Üreaz aktivitesi ve glukoz kullanımı sonuçları *M. mesophilicum* suşları için ayırt edici sonuçlar olarak tespit edilmiştir. Malat kullanmayan tek tür olarak *S. paucimobilis* tespit edilmiştir. Sitrat kullanım testlerinde ise *S. paucimobilis* ve *M. mesophilicum* suşları birlikte negatif sonuç vermiştir. Eskülin hidrolizi ve  $\beta$  -galaktosidaz reaksiyonu sonuçlarında çalışmada kullanılan *Pseudomonas* türlerine ait suşlar ile *M.mesophilicum* suşlarını diğer türlere ait suşlardan ayırdığı tespit edilmiştir.

Çalışılan *Pseudomonas* türlerine ait suşların, triptofandan indol üretimi, glukozdan asit üretimi, üreaz aktivitesi, eskülin hidrolizi, p-nitrofenil- $\beta$ -D-galaktopiranosit testi, glukoz, glukonat, kaprat, malat ve sitrat kullanımı ile oksidaz reaksiyonu sonuçları birbirleriyle aynı olarak tespit edilmiştir. Bu türlerin içerisinde arginin dihidrolaz reaksiyonu sadece *P.stutzeri* MU 70 suşunda negatif olup, diğer *Pseudomonas* suşlarında pozitif sonuç vermiştir. Yine bu türler arasında *P.putida*'ya ait suşlar mannitol ve N-asetil glukozamini kullanmayarak, *P. fluorescens* ve



*P.stutzeri* türlerine ait suşlardan farklı sonuç vermişlerdir. *P.fluorescens* suşlarında mannoz kullanmalarıyla *P.stutzeri* ve *P.putida* türlerine ait suşlardan ayrılmışlardır.

Çalışmada kullanılan *C. luteola* suşları glukozdan asit üretimi, arginin dihidrolaz, jelatin hidrolizi, fenil asetat kullanımı ve oksidaz testleri dışında aynı sonuçları vermiştir. Bu test sonuçlarında sadece *C. luteola* MU 65 için farklı bulunmuştur.

*S.maltophilia* suşları API 20 NE testlerinde nitrat indirgenmesi, kaprat kullanımı ve oksidaz reaksiyonu testleri dışında aynı sonuçları vermiş olup büyük bir benzerlik göstermişlerdir. Fakat bu 3 testin sonuçları *S. maltophilia* suşlarını kendi içinde gruplara ayırmıştır. Bu testlerin sonuçlarına göre nitratı indirgeyemeyen ve kaprat kullanamayan fakat oksidaz reaksiyonu pozitif olan *S.maltophilia* MU 25, MU 52, MU 63, MU 136 suşları bir grup oluşturmuştur. *S.maltophilia* MU 53 ve MU 64 bu testlerden sadece kaprat kullanmaması ile MU 94 ve MU 99 suşları ise bu testlerin hepsine pozitif sonuç vermeleriyle ayrı gruplar oluşturmuşlardır. *S.maltophilia* MU 69 suşu bu testlerin hepsine negatif sonuç vermesiyle, MU 23 nitratı indirgeme ve kapratı kullanma özelliklerini taşımakla birlikte oksidaz reaksiyonunun negatif olmasıyla, MU 137 ise bu testlerden sadece kapratı kullanması ve diğer iki teste negatif sonuç vermesiyle diğer *S.maltophilia* suşlarından farklılık göstermiştir. Bu suşlardan *S.maltophilia* MU 23 suşunun API 20 NE test sonuçları Şekil 1'de verilmiştir.

*S. paucimobilis* türüne ait MU 67 ve MU 145 suşları arabinoz, mannoz ve N-asetil glukozamin kullanım testleri dışında bütün API 20 NE testlerine aynı sonuçları göstermişlerdir. *M. mesophilicum* suşları ise glukoz kullanımı dışındaki testlerin hepsine aynı sonuçları vermişlerdir.

API ZYM enzim testi sonuçlarına göre çalışmaya alınan suşların tamamı esteraz, lösin arilamidaz enzimlerini üretmekte olup,  $\beta$ -glukosidaz,  $\alpha$ -mannosidaz ve  $\alpha$ -fukosidaz enzimlerini üretmemektedirler. *Pseudomonas* türlerine ait suşların hepsinin enzim testlerine göre lipaz,  $\alpha$ -galaktosidaz,  $\beta$ -galaktosidaz,  $\beta$ -glukuronidaz,

$\alpha$ -glukosidaz,  $\beta$ -glukosidaz, N-asetil- $\beta$ -glukozamin,  $\alpha$ -mannosidaz ve  $\alpha$ -fukosidaz üretmedikleri tespit edilmiştir.

API ZYM enzim testi sonuçları gösterdikleri tür içi benzer sonuçlar ile identifikasyona yardım edebilecek sonuçlar vermiştir. Örneğin çalışmada kullanılan *Pseudomonas* cinsine ait türlerin *Pseudomonas* cinsi ile ilişkili diğer türlerden farklı olarak  $\beta$ -galaktosidaz ve  $\alpha$ -glukosidaz enzimlerini üretmedikleri görülmüştür. Çalışmada kullanılan *P. fluorescens*, *P. putida* ve *P. stutzeri* suşları arasında en fazla enzimi 9 enzim üreten *P. putida* MU 83, en az sayıda enzimi de 4 enzim üreten *P. stutzeri* MU 70 suşu olarak tespit edilmiştir. Dikkat çekici bir diğer husus ise çalışmada tek suşla temsil edilen *P. stutzeri* MU 70 suşunun  $\alpha$ -kimotripsin, asit fosfotaz ve naftol fosfohidrolaz üretmemesiyle *P. fluorescens* ve *P. putida* suşlarından ayrılmış olmasıdır.

*C. luteola* suşlarının enzim sonuçları da kendi aralarında çok benzer şekilde tespit edilmiştir. *C. luteola* suşların tamamının alkalın fosfotaz, esteraz, lösin arilamidaz, asit fosfotaz,  $\beta$ -galaktosidaz ve  $\alpha$ -glukosidaz enzimlerini ürettiği ancak lipaz,  $\alpha$ -galaktosidaz,  $\beta$ -glukuronidaz,  $\beta$ -glukosidaz,  $\alpha$ -mannosidaz ve  $\alpha$ -fukosidaz enzimlerini üretmediği tespit edilmiştir. Ancak *C. luteola* MU 65 diğer suşların aksine esteraz lipaz ve  $\alpha$ -kimotripsin üretmekte, varin arilamidaz, sistin arilamidaz, tripsin ve naftol fosfohidrolaz üretmemektedir. *C. luteola* MU 56 ve MU 58 suşlarında N-asetil- $\beta$ -glukozamin enzimini üretmeleriyle diğer *C. luteola* suşlarından ayrılmışlardır.

*S. maltophilia* suşlarının enzim sonuçları da yüksek oranda benzerlik göstermiştir. Bu sonuçlara göre çalışmada kullanılan tüm *S. maltophilia* suşları alkalın fosfotaz, esteraz, esteraz lipaz, lösin arilamidaz, valin arilamidaz, tripsin, asit fosfotaz, naftol fosfohidrolaz ve  $\alpha$ -glukosidaz enzimlerini üretmektedirler. Ancak bu suşların  $\alpha$ -kimotripsin,  $\beta$ -glukuronidaz, N-asetil- $\beta$ -glukozamin,  $\alpha$ -mannosidaz ve  $\alpha$ -fukosidaz enzimlerini üretmedikleri tespit edilmiştir. Lipaz enzimini sadece MU 63 suşunun ürettiği, sistin arilamidaz enzimini ise MU 63 suşu ile birlikte MU 23 suşunun ürettiği görülmüştür. *S. maltophilia* MU 64, MU 94 ve MU 99 suşları aynı

enzimleri üreterek kendi aralarında bir grup oluştururken, MU 25 ve MUS2 suşları ile MU 69 ve MU 136 suşlarında birbirleriyle aynı enzim sonuçlarını vererek gruplar oluşturmuşlardır.

*S. paucimobilis* suşlarının alkalın fosfotaz, esteraz, esteraz lipaz, lösin arilamidaz, valin arilamidaz, asit fosfotaz, naftol fosfohidrolaz,  $\beta$ -galaktosidaz ve  $\alpha$ -glukosidaz enzimlerini ürettiği, lipaz, sistin arilamidaz,  $\alpha$ -galaktosidaz,  $\beta$ -glukuronidaz,  $\beta$ -glukosidaz,  $\alpha$ -mannosidaz ve  $\alpha$ -fukosidaz enzimlerini üretmediği tespit edilmiştir. *S. paucimobilis* MU 67 suşu tripsin üretmiyor olması ve N-asetil- $\beta$ -glukozamin üretmesi ile çalışılan tüm suşlardan ayrılmaktadır (Şekil 2). Diğer *S. paucimobilis* MU 145 ise tripsin,  $\alpha$ -kimotripsin üretmesi ve N-asetil- $\beta$ -glukozamin üretmemesi ile MU 67'den farklılık göstermektedir.

Çalışmada kullanılan *M. mesophilicum* suşlarının iki enzim dışında tüm enzim sonuçları aynıdır. Her iki suşta esteraz, esteraz lipaz, lösin arilamidaz, tripsin ve naftol fosfohidrolaz enzimlerini üretmektedirler. *M. mesophilicum* MU 140, *M. mesophilicum* MU 141'den alkalın fosfotaz ve asit fosfotaz üretmesi ile ayrılmaktadır. Her iki suşta lipaz, valin arilamidaz, sistin arilamidaz,  $\alpha$ -kimotripsin,  $\alpha$ -galaktosidaz,  $\beta$ -galaktosidaz,  $\beta$ -glukuronidaz,  $\alpha$ -glukosidaz,  $\beta$ -glukosidaz, N-asetil- $\beta$ -glukozamin,  $\alpha$ -mannosidaz ve  $\alpha$ -fukosidaz üretmemektedir.

Çalışmada yapılan antibiyotik testlerinde suşların tümü, aztreonam antibiyotiğine dirençli bulunmuştur. Penisilin ve ampicilin antibiyotiklerine ise *M. mesophilicum* MU 140 ve MU 141 hariç diğer tüm suşlar dirençli bulunmuştur. Ayrıca seftriakson ve sefalotin antibiyotiklerine karşı *S. paucimobilis* ve *M. mesophilicum* suşları dışındaki tüm suşların dirençli olduğu tespit edilmiştir.

Çalışmada kullanılan *Pseudomonas* genusuna ait türlerin  $\beta$ -laktam grubu antibiyotiklere karşı duyarlılık sonuçlarına bakıldığında bu suşların penisilin grubu antibiyotiklere karşı dirençli oldukları tespit edilmiştir. Bu grup antibiyotiklerden mezlosiline bu suşların tamamı dirençli olarak tespit edilirken, piperasillin antibiyotiği *P. fluorescens* MU 66 ve MU 75 ve *P. stutzeri* MU 70 suşlarına etkili

diğer *Pseudomonas* suşlarına etkisiz olarak tespit edilmiştir.  $\beta$ -laktam/ $\beta$ -laktamaz inhibitör kombinasyonu olan tikarsilin+klavulanik asit ise sadece *P.stutzeri* MU 70 suşuna etkili olmuş, *P.fluorescens* ve *P.putida* suşlarına etkisiz olarak tespit edilmiştir. Sefalosporin grubu antibiyotiklerinde çalışmadaki *Pseudomonas* genusuna ait türlerin suşlarına karşı etkili olmadıkları tespit edilmiştir. Bu grup antibiyotikler içerisinde en yüksek inhibisyon aktivitesini 3.kuşak sefalosporinlerden seftazidim antibiyotiği göstermiş olup, bu suşların yarısına karşı etkili bulunmuştur. Ayrıca çalışmaya dahil edilen tüm suşlar içerisinde yine 3. kuşak sefalosporinlerden olan sefotaksime tek duyarlı suş olarak *P.putida* MU 83 tespit edilmiştir. *P.fluorescens*, *P.putida* ve *P.stutzeri* suşları karbapenemlerden çalışmada kullanılan imipeneme karşı yüksek duyarlılık göstermişlerdir. Aynı suşlar monobaktam grubu antibiyotiklerden aztreonama karşı yüksek oranda dirençli bulunmuşlardır.

Çalışmadaki *Pseudomonas* türlerine ait suşlara karşı en yüksek aktivite aminoglikozit grubu antibiyotikler tarafından sağlanmış olup bu suşların tamamı bu grup antibiyotiklere duyarlı olarak tespit edilmişlerdir. Tetrasiklin ise *P.fluorescens* ve *P.stutzeri* suşlarına karşı etkili ancak *P.putida* suşlarına karşı etkisiz olarak tespit edilmiştir. Kinolon grubu antibiyotiklerinde çalışmadaki *Pseudomonas* türlerine ait suşlara karşı etkili olduğu tespit edilmiş olup, bu grup antibiyotiklerden norfloksasin siprofloksasine göre daha etkili bulunmuştur. Bu etki *P.fluorescens* MU 87 suşunda da Şekil 3'de görülmektedir. Ayrıca bu suşların tamamı kloramfenikole dirençli olarak bulunmuştur. Sülfanomid grubu antibiyotiklerden trimetoprim+sulfametaksazolünde bu suşlara karşı etkili olmadığı tespit edilmiştir.

Bu sonuçlar çalışmada kullanılan *Pseudomonas* türlerine ait suşlara karşı en etkili antibiyotik grubunun aminoglikozid grubu antibiyotikler olduğunu göstermiştir. Karlowsky ve ark. yapmış oldukları çalışmada kullandıkları *Pseudomonas* türüne ait suşların % 82.9'una aminoglikozid grubu antibiyotiklerden gentamisin'in etkili olduğunu bulmuşlardır (Karlowsky, J.A. et al. 2002). Bu sonuç bizim sonuçlarımızla gösterdiği paralellik açısından önemlidir. Ancak *P.fluorescens* ve *P.putida* suşlarının gentamisine duyarlı bulunması Rolston ve ark. sonuçlarıyla karşıtlık göstermektedir (Rolston, K.V. et al. 1990).

Genel olarak  $\beta$  laktam grubu antibiyotiklere karşı suşların göstermiş oldukları yüksek direnç yanı sıra bu grup antibiyotiklerden piperasillin, imipenem ve seftazidime karşı duyarlılık tespit edilmiştir. Örneğin Isenberg et al. yaptıkları çalışmada kullandıkları *Pseudomonas* spp. suşlarının % 90 oranında imipeneme duyarlı olduklarını bildirmişlerdir. Bu çalışma sonuçlarında göz önüne alındığında bu grup antibiyotiklerden imipenemin yüksek etkisi çalışma sonuçlarımızla bir kez daha ortaya konulmuştur (Isenberg, H.D. et al. 1999). Aynı çalışmada, sefalosporin grubu antibiyotiklerden seftriaksona suşların % 33 oranında duyarlılık gösterdiği bildirilmiş olup bizim çalışmamızda bu suşların hepsi bu antibiyotiğe dirençli iken bu grup antibiyotiklerden seftazidimin daha etkili olduğu bulunmuştur (Isenberg, H.D. et al. 1999). Yine Speciale et al. yaptıkları çalışmada kullandıkları tüm *Pseudomonas* türlerine ait suşların seftazidime ve imipeneme duyarlı olduğunu bildirmiştir. Bu çalışma sonuçlarında bizim sonuçlarımızla aynı olduğu ve seftazidimin etkisini ortaya koyduğu için önem arz etmektedir (Speciale, A. et al. 2000). Shibl et al. yaptıkları çalışmada bizim çalışma sonuçlarımızı destekleyecek şekilde tüm *Pseudomonas* türü suşlara gentamisin ve seftazidim antibiyotiklerinin etkili olduğunu rapor etmişlerdir (Shibl, A.M. et al. 1997).

Çalışmada kullanılan *C.luteola* suşları penisilin grubu antibiyotiklere dirençli bulunurken, *C. luteola* MU 65 hariç diğer suşlar  $\beta$ -laktam/  $\beta$ -laktamaz inhibitör kombinasyonu antibiyotiklerden tikarsilin+klavulanik asite duyarlı olarak tespit edilmişlerdir. Bu suşların sefalosporin grubu antibiyotiklere de dirençli oldukları görülmüş, sadece 3. kuşak sefalosporinlerden seftazidim ve sefepim antibiyotiklerinin *C. luteola* MU 18 ve MU 96 suşlarına karşı etkili olduğu tespit edilmiştir. Karbapenem grubundan olan imipenemin ise *C. luteola* MU 18, MU 65 ve MU 96 suşlarına etkili olduğu görülmüştür. Monobaktam grubu antibiyotiklerden aztreonamada ise tüm suşların olduğu gibi *C.luteola* suşlarında dirençli olduğu tespit edilmiştir.

*C.luteola* suşlarına aminoglikozid grubundan tobramisin ve netilmisin etkili bulunurken, amikasin ve gentamisinin etkisiz olduğu tespit edilmiştir. *C. luteola*

MU 65 suşunun hem amikasin hem de netilmisine duyarlı bulunması ise diğer antibiyotiklere gösterdiği yüksek dirençlilikten dolayı dikkat çekicidir. Ayrıca bu suş harici *C.luteola* suşlarının tamamı tetrasikline dirençli bulunmuştur. Kinolon grubu antibiyotiklerden siprofloksasine bu suşların tamamı dirençli bulunmuş ancak yine aynı grup antibiyotiklerden norfloksasinin MU 65 dışındaki tüm suşlara etkili olduğu tespit edilmiştir. Kloramfenikol sadece *C.luteola* MU 56 suşuna etkili bulunmuş diğer *C.luteola* suşlarına etkisiz olarak tespit edilmiştir. Sulfanomid grubu bir antibiyotik olan trimetoprim+sulfametaksazola ise çalışmadaki *C.luteola* suşlarının tamamı duyarlı olarak tespit edilmiştir.

Çalışmamızda *C.luteola* suşlarının göstermiş olduğu antibiyotik duyarlılık tablosu 3. kuşak sefalosporinlere, aminoglikozidlere ve kinolon grubu antibiyotiklere duyarlı olmaları nedeniyle Fass ve ark. çalışmasıyla benzer sonuçlar vermiştir (Fass, R.J. et al. 1980). Ayrıca Rastogi ve ark. da çalışmalarında kullandıkları *C.luteola* suşlarında bu sonuçlara benzer duyarlılık sonuçları elde ettiklerini rapor etmişlerdir (Rastogi, S. et al. 1998).

Yapılan antibiyotik dirençlilik testlerinde en yüksek oranda dirençlilik tablosunu *S. maltophilia* suşları göstermiştir. Bu suşlara karşı neredeyse tüm antibiyotik gruplarına ait antibiyotikler etkisiz kalmış ve suşların büyük bir kısmı bu antibiyotiklere dirençli olarak tespit edilmiştir. Bu suşların tümü penisilinlere,  $\beta$ -laktam/ $\beta$ -laktamaz inhibitör kombinasyonu antibiyotiklere, sefalosporinlere, monobaktamlara, kloramfenikole dirençli olarak tespit edilmişlerdir. Bu suşların içerisinde *S. maltophilia* MU 53 en duyarlı suş olarak tespit edilmiştir. Bu suş dışındaki diğer *S. maltophilia* suşlarının tümü karbapenemlere, aminoglikozidlere ve tetrasiklinlere de dirençli bulunmuşlardır.

Çalışmada *S. maltophilia* suşlarına karşı en etkili antibiyotik olarak sulfanomid grubu bir antibiyotik olan trimetoprim+sulfametaksazol tespit edilmiştir. Bu antibiyotik *S. maltophilia* MU 64, MU 69 ve MU 99 suşları dışında tüm *S.maltophilia* suşlarına etkili bulunmuştur. Bu suşlara karşı etkili bulunan diğer bir antibiyotik ise kinolon grubu antibiyotiklerden siprofloksasin olarak tespit edilmiş olup bu grubun diğer antibiyotiği norfloksasine ise tüm suşların dirençli olduğu

görülmüştür. Bu sonuçlara göre *S. maltophilia* suşlarına, *Pseudomonas* genusuna ait türlerin aksine, norfloksasinin yerine siprofloksasinin etkili olduğu görülmüştür. Ayrıca *S. maltophilia* suşlarına etkili olduğu birçok çalışmada belirtilen trovafloksasin antibiyotiği de çalışmada kullanılan *S. maltophilia* suşlarına karşı etkisiz bulunmuştur.

*S. maltophilia* suşlarıyla yapılmış olan çalışmaların birçoğunda çalışmamızda bulmuş olduğumuz yüksek antibiyotik dirençliliği görülmüştür. Isenberg ve ark. yapmış oldukları çalışmada 20 adet *S. maltophilia* suşunun tamamının seftriakson ve imipeneme dirençli olduğunu, %20 oranında sefaperazon, % 25 oranında ise siprofloksasine duyarlı olduğunu bulmuştur. Bu çalışmada suşların % 90 oranında trovafloksasine duyarlı olduğu rapor edilmiştir (Isenberg, H.D. 1999). Krueger, T.S. ve ark.da *S. maltophilia* suşlarıyla yaptıkları çalışmada suşların aztreonama karşı % 85.7, imipeneme % 90.5 oranında dirençlilik gösterdiklerini, bunun yanı sıra tikarsilin+klavulanik asit, trimetoprim+sulfametaksazol ve trovafloksasine karşı yüksek duyarlılık gösterdiğini rapor etmişlerdir (Krueger, T.S. et al. 2001). Bu çalışma sonuçları her ne kadar aztreonam ve imipenem antibiyotiklerine karşı duyarlılık sonuçlarında paralellik gösterse de tikarsilin+klavulanik asit ve travofloksasin sonuçlarında farklılık göstermektedir.

Ancak trimetoprim+sulfametaksazol antibiyotiğinin gösterdiği duyarlılık Krueger ve ark. sonucuyla benzer sonuç vermiştir. Bu farklılığın bizim çalışma suşlarımızın klinik kaynaklı olmamasına bağlı olabileceği düşünülmüştür. Karlowsky ve ark.'da yaptıkları çalışmada *S. maltophilia* suşlarına karşı en etkili antibiyotik olarak trimetoprim+sulfametaksazolü tespit etmişlerdir (Karlowsky, J.A. 2002). Yine aynı sonuç Giamarellos-Borboulis ve ark. tarafından *S. maltophilia* suşlarına karşı yaptıkları antimikrobiyal duyarlılık sonuçlarında rapor edilmiştir (Giamarellos- Bourboulis, E. et al. 2002). Denton et al. yaptıkları çalışmada *S.maltophilia* suşlarına karşı trimetoprim+sulfametaksazol dışındaki antibiyotiklerin etkisiz olduğunu rapor etmişlerdir. Bu çalışmalardan ve çalışma sonuçlarımıza göre *S.maltophilia* kaynaklı enfeksiyonlara karşı tedavide en etkili olabilecek antibiyotik olarak trimetoprim+ sulfametaksazol görülmektedir.

Çalışmadaki *S.paucimobilis* türüne ait suşların antibiyotiklere karşı duyarlılık durumlarına bakıldığında *S.paucimobilis* MU 67 suşunun *S.paucimobilis* MU 145 suşuna göre daha fazla dirençli bir suş olduğu görülmektedir. *S.paucimobilis* suşlarının penisilin grubundan mezlosiline duyarlı, piperasiline ise dirençli olduğu görülmüştür.  $\beta$  -laktam/ $\beta$ -laktamaz inhibitör kombinasyonu antibiyotiklerden tikarsilin+klavulanik asite duyarlı bulunmuşlardır. Sefalosporin grubu antibiyotiklere de 3.kuşak sefalosporin sefotaksim dışında duyarlı olarak tespit edilmişlerdir. Bu suşların karbapenemlerden imipeneme duyarlı olduğu görülmüştür. Ancak bu suşlarda monobaktam grubundan aztreonama dirençlidirler. *S.paucimobilis* MU 67 tüm aminoglikozid grubu antibiyotiklere dirençli olmasıyla *S.paucimobilis* MU 145 suşundan farklı özellik göstermiştir. Her iki suş tetrasikline karşı dirençli olarak tespit edilmiştir. *S.paucimobilis* suşları kinolon grubu antibiyotiklerden siprofloksasine karşı dirençli olarak tespit edilmiştir. Ancak diğer bir kinolon grubu antibiyotik olan norfloksasin ise aminoglikozidlerin tersine *S.paucimobilis* MU 67 suşuna etkili, *S.paucimobilis* MU 145 suşuna etkisiz olarak tespit edilmiştir. Ayrıca bu suşlara karşı kloramfenikol etkili bulunmuş, sülfanomid grubundan trimetoprim+sulfametaksazol ise etkisiz olarak tespit edilmiştir.

Miranda C.D. ve ark. Şili tatlı su balıklarından elde ettikleri *S.paucimobilis* suşlarıyla yapmış oldukları çalışmada bu suşların gentamisin dışındaki aminoglikozidlere dirençli olduklarını, penisilinlerden ampisiline % 80 oranında, 3.kuşak sefalosporinlerden sefotaksime ise suşların yarısının dirençli olduğunu bildirmiştir. Bu sonuçlar çalışmamızın sonuçlarıyla benzerlik göstermekle birlikte yine aynı çalışmada suşların % 90 oranında tetrasikline, % 40 oranında kloramfenikole ve % 30 oranında trimetoprim/sulfametaksazole dirençli olduğu rapor edilmiştir (Miranda, C.D. et al. 2002).

*M. mesophilicum* suşlarının ise denenen birçok antibiyotiğe karşı duyarlı oldukları tespit edilmiştir. Bu türe ait suşlar penisilin grubundan mezlosiline duyarlı bulunmuştur. *M. mesophilicum* suşları 3. kuşak sefalosporinlerden seftazidime ve monobaktam antibiyotiklerden aztreonama dirençli bulunmuşlardır.



Karbapenemlerden imipenemde bu suşlara karşı çok yüksek bir inhibisyon etkisi göstermiş olup en büyük inhibisyon zon çapları bu antibiyotik tarafından meydana getirilmiştir. Ayrıca bu sonuçların yanı sıra *M. mesophilicum* suşlarının aminoglikozid grubu antibiyotiklerden gentamisine duyarlı olduğu görülmüştür. Tetrasiklinde bu suşlara karşı etkili olarak tespit edilmiştir. Kinolon grubu antibiyotiklerden siprofloksasin ve sulfanomid preparatı olan trimetoprim+sulfametaksazolde bu suşlara karşı etkili olarak tespit edilmişlerdir. *M.mesophilicum* MU 140 suşu kloramfenikole dirençli olarak tespit edilmiştir. *Methylobacterium* türlerine ait antimikrobiyal aktivite çalışmalarının pek yapılmadığı ve bu türe ait suşların genellikle biodegradasyon çalışmalarında kullanıldıkları görülmüş olup çalışmamız bu suşların antibiyotiklere karşı duyarlılık durumlarını ortaya koyması açısından önemlidir.

Suşların agar dilüsyon metodu ile tespit edilen ağır metal dirençliliklerinde kullanılan metallerin seçiminde su kaynaklı bakterilere karşı daha önceki çalışmalarda denenmiş olan ağır metaller gözönüne alınmıştır. Çalışmadaki suşların bu ağır metallere karşı dirençli olup olmadıkları yine daha önce bu konuda yapılmış olan çalışmalarda ortaya çıkmış standart konsantrasyonlara göre değerlendirilmiştir (Nieto, J.J. et al. 1989; Washington, J.A. and Sutter, V.L. 1980).

Ağır metal dirençlilik testlerinde suşların tümünün çinko sülfatı tolere edebildiği görülmüştür. Suşların büyük bir kısmının  $20 \text{ mmol}^{-1}$  çinko konsantrasyonu içeren ortamda gelişme göstermesi suşların bu metale karşı yüksek toleransa sahip olduğunu göstermiştir. En düşük çinko konsantrasyonu ile etkilenen suş ise  $0.5 \text{ mmol}^{-1}$  konsantrasyonda gelişme gösteremeyen *S.paucimobilis* MU 67 suşu olarak tespit edilmiştir. Bununla benzer bir şekilde *S.paucimobilis* MU 67 suşu dışında tüm suşlar kurşun asetatı dirençli bulunmuşlardır. Bu metallerin tersine kobalt, krom, civa ve gümüş suşlara yüksek oranda toksik etkili olmuştur. Kobalt ve gümüşe *M. mesophilicum* suşları dışındaki tüm suşların  $1 \text{ mmol}^{-1}$  konsantrasyondan daha düşük konsantrasyonlarda inhibe oldukları görülmüş ve bu suşlar diğer genoslara ait suşlardan kolayca ayrılmıştır. Nikel metalinin ise *S.maltophilia* dışındaki suşlar için toksik olduğu görülmüş olup, *S.maltophilia* suşlarında  $1 \text{ mmol}^{-1}$  konsantrasyonun

üzere konsantrasyonlarda üreyemedikleri tespit edilmiştir. Ayrıca suşların içerisinde bakır metaline karşı en yüksek toleransı,  $2.5 \text{ mmol}^{-1}$  konsantrasyonda gelişim gösterebilen *S.maltophilia* MU 99 ve *M. mesophilicum* MU 141 suşları göstermiştir.

*P. fluorescens* suşlarının tümü ağır metallere karşı aynı özellikleri göstermişlerdir. Bu suşların nikel, kobalt, bakır, krom, civa ve gümüşe duyarlı oldukları tespit edilmiştir. *P.putida* MU 73 ve MU 83 suşlarının bakıra dirençli olduğu ve *P.putida* suşların bakır dışında diğer metallere karşı dirençlilik durumlarının ise *P.fluorescens* suşları ile aynı olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4). *P.stutzeri* MU 70 suşu ise ağır metallere karşı gösterdiği dirençlilik durumu ile *P. fluorescens* ve *P.putida* ile büyük oranda benzerlik göstermiştir. Bu suşun *P. fluorescens* ve *P.putida* suşlarından tek farklı özelliği ise potasyum kromatın  $1 \text{ mmol}^{-1}$  konsantrasyonunu tolere edebilmesidir.

Hassen, A. ve ark.'da yapmış oldukları çalışmada *P.aeruginosa* suşlarına karşı krom, bakır, çinko, kobalt ve civa metallerinin toksik etkisini araştırmışlar ve bu metallerin toksik etki yapan konsantrasyonlarını belirlemişlerdir. Bu çalışmada suşların krom, bakır, çinko ve kobalt metallerinin  $1 \text{ mmol}^{-1}$  konsantrasyonunda inhibe oldukları, civa metalinin ise  $0.1 \text{ mmol}^{-1}$  konsantrasyonunun toksik etkili olduğu bildirilmiştir (Hassen, A. et al. 1998). Bu çalışma sonuçları bizim sonuçlarımızla çinko metaline karşı duyarlılık sonuçları dışında benzerlik göstermesi açısından önemlidir. Ayrıca çalışma suşlarımızın çinkoya karşı dirençliliği Rossbach, S. ve ark.'larının *P.fluorescens* suşları üzerinde yapmış oldukları çalışma sonuçları ile de orantılıdır (Rossbach, S. 2000).

*C. luteola* suşlarının ağır metallere karşı dirençlilik durumları ise çalışmada kullanılan *Pseudomonas* türlerine ait suşların çizdiği tabloya benzemektedir. *C.luteola* suşları da çinko ve kurşun dışındaki ağır metallere duyarlı bulunmuşlardır. Sadece *C. luteola* MU 18 ve MU 96 suşları  $1 \text{ mmol}^{-1}$  bakır konsantrasyonunda üreme göstermiş olup diğer *C. luteola* suşları ise bu konsantrasyonun altında inhibe olmuşlardır.

*S.maltophilia* suşları ise çinko, kurşun ve bakır metallerine karşı dirençli olarak tespit edilmişlerdir. Bu suşlar çalışmaya alınan diğer suşlardan bakır metaline karşı dirençli olmalarıyla ayrılmışlardır. Tüm *S.maltophilia* suşları kobalt, civa ve gümüşe duyarlı olarak tespit edilmişlerdir. Bu suşlardan sadece *S.maltophilia* MU 136 suşu  $1 \text{ mmol}^{-1}$  krom konsantrasyonunda üreme göstermiş olup diğer *S.maltophilia* suşları ise bu konsantrasyondan daha küçük konsantrasyonlarda inhibe olmuşlardır. Nikel metaline ise *S.maltophilia* MU 23, MU 94 ve MU 99 suşları duyarlı bulunurken, diğer suşların nikeli tolere edebildiği görülmüştür.

*S.paucimobilis* suşlarına ise çinko ve kurşun dışındaki ağır metallerin yüksek derecede toksik etki gösterdikleri tespit edilmiştir. Bu suşların herikisi de çinkonun yüksek konsantrasyonlarında gelişme gösterebilmişken, kurşunun  $0.5 \text{ mmol}^{-1}$  konsantrasyonunun *S.paucimobilis* MU 67 suşunu inhibe ettiği tespit edilmiştir.

*S.paucimobilis* suşlarının kadmiyum metaline karşı yüksek tolerans gösterdikleri Tangaromsuk ve ark. tarafından rapor edilmiştir (Tangaromsuk, J. et al. 2002). Ayrıca Richau, J.A. ve ark.'larının *S.paucimobilis* suşları ile yaptıkları çalışmada  $0.5 \text{ mmol}^{-1}$  bakır konsantrasyonunun bu suşlar için toksik olduğunu bulmuşlardır (Richau, J.A. et al. 1997). Bu sonuç çalışma sonuçlarımızı doğrulaması açısından da önemli bulunmuştur.

Bu çalışmada *M.mesophilicum* suşları ağır metalleri en fazla tolere eden bakteriler olmuştur. *M.mesophilicum* MU 140 suşu krom dışındaki tüm ağır metallerin  $1 \text{ mmol}^{-1}$  konsantrasyonluk ortamlarında gelişme göstermiş olup, *M.mesophilicum* MU 141 suşu da krom ve nikel hariç diğer metallere dirençli bulunmuştur.

Elde edilen plazmid profili sonuçlarına göre çalışmada kullanılan 28 adet suşun 5 adedinin plazmid taşıdığı tespit edilmiştir. Bu suşların 3'ü *S.maltophilia* türüne, biri *P.fluorescens* ve biride *M. mesophilicum* türlerine ait suşlar olarak tespit edilmiştir. Bu suşların taşıdıkları plazmid profilleri aynı jelde yürütülmüş ve polaroid fotoğraf makinesi ile görüntülenmiştir (Şekil 5). Elde edilen plazmid profillerine

göre, çalışmada kullanılan bakterilerin plazmidlerinin moleküler ağırlıklarının 0.89 kb ile 21.59 kb ile arasında değiştiği saptanmıştır.

*S.maltophilia* MU 52 suşu taşıdığı 5 adet plazmid ile çalışmada en fazla plazmid taşıyan suş olarak tespit edilmiştir. Bu suşun taşıdığı plazmidlerin moleküler ağırlıkları ise 13.86, 6.24, 5.71, 2.35 ve 0.89 kb olarak hesaplanmıştır. *S.maltophilia* MU 63 suşunun ise 6.24 ve 2.57 kb moleküler ağırlığında iki plazmid taşıdığı tespit edilmiştir. Plazmid taşıyan son *S.maltophilia* suşu ise MU 69 olup 13.86 kb'lık bir adet plazmid taşıdığı görülmüştür.

*Pseudomonas* genusuna ait türler arasında plazmid taşıyan tek tür olarak *P.fluorescens* görülmüş ve *P.fluorescens* MU 87 suşunun 21.59 ve 12.68 kb'lık 2 adet plazmid taşıdığı tespit edilmiştir.

*Pseudomonas* genusu ile ilişkili genoslardan *Stenothrophomonas* genusu dışında plazmid taşıyan tek suşun *Methylobacterium* genusuna ait olduğu görülmüştür. *M.mesophilicum* MU 141 suşunun 21.59 ve 11.61 kb moleküler ağırlığında iki adet plazmid taşıdığı tespit edilmiştir. Bunun yanı sıra çalışmada kullanılan *Chryseomonas* ve *Sphingomonas* suşlarının plazmid taşımadıkları tespit edilmiştir.

Yapılan protein profili çalışmalarında suşların toplam hücre proteinleri Pot ve ark.'nın uygulamış oldukları metoda göre ekstrakte edilmiş ve % 10'luk SDS-PAGE'de koşturulmuştur. Suşlar kendi aralarında gruplandırılarak yürütülmüştür.

Şekil 6'da görüldüğü gibi çalışmada kullanılan *Pseudomonas* türlerine ait suşların protein bantları birbirleriyle oldukça benzerlikler göstermiştir. Bu bantların kendi aralarındaki ilişkiyi ortaya çıkarmak için yapılan dendrogram grafiğide Şekil 7'de görülmektedir. 116 kDa'luk marker bandının üstünde bulunan dominant protein bandının *P.stutzeri* MU 70 suşu haricindeki suşların hepsinde olduğu görülmüştür. Aynı aralıkta ise *P.stutzeri* MU 70 suşunun iki dominant bant taşıdığı saptanmıştır.

Protein bantlarına bakıldığında *P.fluorescens* MU 66 ve *P.fluorescens* MU 75 suşlarının 66.2 kDa, 45 kDa, 35 kDa ve 18.4 kDa'luk marker bantlarıyla aynı hizalarda benzer dominant bantlar taşıdıkları görülmüştür. Bu suşların benzer protein bant yapısı dendrogramlarında da görülmektedir. *P.fluorescens* MU 87 suşunun ise 116 – 62 kDa'luk markerlar arasında diğer *P.fluorescens* suşlarından farklılıklar gösterdiği görülmüştür. Bu suş diğer *P.fluorescens* suşlarıyla 45 ve 35 kDa'luk markerlar ile aynı hizada ortak bantlar taşısa da 35 kDa'luk marker hizasının altında farklı bir protein bant yapısı göstermektedir. Ayrıca *P.fluorescens* MU 87 suşu ile *P.fluorescens* MU 97 suşunun 66.2-25 kDa moleküler ağırlıklı markerlar arasında benzerlik gösterdiği saptanmıştır.

Farklı türlere ait iki suş olan *P.fluorescens* MU 87 ile *P.putida* MU 139 benzer bir protein profili göstermişlerdir. Bu protein bantlarında görülen benzerlik bu suşların dendrogramlarında da görülmektedir. *P.fluorescens* MU 97 suşu ile *P.putida* MU 73 ve *P.putida* MU 83 suşlarının protein profillerinin birbiriyle çok benzer bir bant yapısı taşıdıkları görülmüştür. Fakat bu 3 suşu diğer suşlardan ayıran en büyük fark olarak 14.4 kDa'luk marker bandının altında taşıdıkları birer adet dominant protein bandı olarak tespit edilmiştir. Bu 3 suşun dendrogramdaki görünümünde çok yakın benzerlikler gösterdiklerini doğrulamaktadır. *P.stutzeri* MU 70 suşu taşıdığı protein bant profili ile diğer suşların protein bantlarından farklılık göstermiştir. Bu suş 66.2, 45 ve 35 kDa'luk marker bantlarıyla aynı hizada dominant bantlar taşımaktadır.

*Pseudomonas* türlerine ait suşların protein profilleri ve taşıdıkları protein bantlarına göre hazırlanan dendrogramlarında bu suşların taşıdıkları benzer protein bantlarına göre gruplar oluşturdukları görülmüştür. Örneğin *P.fluorescens* MU 66 ve MU 75 taşıdıkları protein bantlarıyla ve dendrogramda da görüldüğü gibi çok benzer bulunmuştur. Bu suşların diğer testlere verdikleri sonuçlara bakıldığında arabinozu kullanma ve alkalın fosfotaz üretme özellikleri dışında yapılan diğer testlerin hepsinde aynı sonuçları verdikleri görülmüştür.

*P.fluorescens* MU 87 ve *P.putida* MU 139 suşlarının farklı türler olmaları yanı sıra hem protein bantlarında hem de dendrogramlarında benzer özellikler taşıdıkları görülmüştür. Daha önce yapılan testlere bakıldığında gerçektende bu suşların özellikleri arasında yüksek oranda benzerlikler görülmüştür. Ancak burada *P.fluorescens* MU 87 suşunun MU 66 ve MU 75 suşlarından farklı bir protein profili göstermesi daha önce yapılan birçok testteki bu suşlar arası farklılıkları doğrulaması açısından önemlidir.

*P.fluorescens* MU 97 suşu ile *P.putida* MU 73 ve *P.putida* MU 83 suşlarının protein profillerinin birbiriyle çok benzer bir bant yapısı taşıdığı görülmüştür. Şekil 7'deki *Pseudomonas* türlerine ait suşların dendrogramlarında da bu suşlar arasında en yakın ilişkinin bu 3 suşta olduğu görülmüştür. Bu suşların farklı türlere ait olmasına bağlı olarak API 20 NE testlerinde farklılıklar görülmesine rağmen enzim testlerine bakıldığında *P.fluorescens* MU 97 suşu ile *P.putida* MU 73 suşunun aynı enzim aktivitesini gösterdiği görülmüştür. *P.putida* MU 83 suşu da bu iki suştan sadece valin arilamidaz ile sistin arilamidaz üretmesiyle farklılık göstermiştir. Bu suşların antibiyotik ve ağır metal test sonuçlarına bakıldığında ise MU 97 ile MU73 arasında büyük benzerlikler görülmekle birlikte MU 83 suşu ufak farklılıklar göstermektedir.

Dendrogram ve protein bantlarına bakıldığında *P.stutzeri* MU 70 diğer *P.fluorescens* ve *P.putida* suşlarından kolayca ayrılmaktadır. Protein profillerinde görülen bu farklı yapı bu suşun diğer testlerinde de kendini göstermiş olup, bu suş diğer suşlardan farklı sonuçlar vermiştir.

Şekil 8'de ise ilk 5 bantta *C.luteola*, bu bantların ardından ilk 2 bantta *S.paucimobilis* ve son 2 banttada *M.mesophilicum* suşlarına ait protein bantları görülmektedir. Bu suşlara ait dendrogram ise Şekil 9'da verilmiştir. Bu protein bantlarını değerlendirdiğimizde türler arasındaki protein bantlarının farklılıkları yanı sıra tür içi bant farklılıklarının da olduğu tespit edilmiştir. Öyleki *C.luteola* suşları bu protein profillerine göre 3 farklı protein profili göstermiştir. Bu suşlardan *C.luteola* MU 18 ve *C.luteola* MU 96 suşlarının 116-66.2 kDa'luk marker aralığında

benzer 3 dominant bant yanı sıra, 45 kDa'luk markerla aynı mesafede ortak ve 25-18.4 kDa'luk marker aralığında benzer 2 dominant bant taşıdığı görülmüş ve sonuç olarak bu iki suşun çok yakın bir bant profili taşıdığı tespit edilmiştir. Bu suşların göstermiş olduğu bu yakınlık dendrogramlarında da görülmüştür.

*C.luteola* MU 56 ve *C.luteola* MU 58 suşlarında birbiriyle benzer şekilde diğer *C.luteola* suşlarından farklı bir protein profili göstermişlerdir. Bu suşlarında benzer şekilde 116 kDa'luk marker bandının hemen alt hizasında, 45- 35 kDa'luk markerlarla aynı hizada ve 18.4 kDa'luk marker bandının altında 2 ortak bant olmak üzere 5 dominant bant taşıdıkları görülmüştür. *C.luteola* MU 65 ise taşıdığı protein bantları bakımından diğer *C.luteola* suşlarından çok farklı bir protein profili göstermiştir. Bu suş 116 kDa'luk marker hizasında taşıdığı dominant bir bant ile diğer *C.luteola* suşlarından kolayca ayrılmıştır. Bu suşların dendrogramlarında da *C.luteola* MU 56 ve MU 58 suşlarının gösterdiği benzerlik ve *C.luteola* MU 65 suşunun farklılığı kolayca görülmektedir.

*C.luteola* MU 18 ve MU 96 suşlarının protein bantları ve dendrogramlarında gösterdikleri benzerlik bu iki suşun yapılan identifikasyon ve enzim testleri yanı sıra, antibiyotiklere ve metallere gösterdikleri direnç durumlarıyla birlikte, plazmid taşımamalarıyla da kendini göstermiştir.

*C.luteola* MU 56 ve *C.luteola* MU 58 suşlarında, MU 58 suşunun kloramfenikole dirençli olması dışında yapılan bütün testlere aynı sonuçları vermiştir. Protein bantlarının yapısıyla ve dendrogramda diğer *C.luteola* suşlarından kolayca ayrılan MU 65 suşunun yapılan tüm testlerde farklılıklar gösterdiği tespit edilmiştir. Bu suşun identifikasyon testlerinde glukoz, arginin, jelatin, fenil asetat ve oksidaz testlerinde diğer *C.luteola* suşlarından farklı sonuçlar elde edilmiştir. Enzim testlerinde ise diğer suşlardan esteraz lipazı ve -kimotripsin üretmesiyle, valin arilamidaz, sistin arilamidaz, tripsin ve naftol fosfohidrolaz üretmemesiyle farklılık göstermiştir. Ayrıca antibiyotiklere karşı dirençlilik durumunda yine diğer *C.luteola* suşlarından farklılıklar göstermektedir.

*S.paucimobilis* MU 67 ve *S.paucimobilis* MU 145 suşlarının protein bantları birbiriyle fazla benzerlik göstermediği halde dendrogramlarında bu suşların kendi aralarında diğer suşlara göre daha yakın ilişkili oldukları görülmüştür. Bu suşların protein bantlarına bakıldığında her iki suşunda 116 kDa'luk marker hizasının altında aynı hizada bantları olduğu fakat MU 145 suşunun taşıdığı dominant bantla MU 67 suşundan farklı olduğu görülmüştür. Bunun yanı sıra MU 67 suşunda 35 kDa'luk markerla aynı hizada taşıdığı bir adet ve 18.4-14.4 kDa'luk markerlar arasında taşıdığı 2 adet dominant bant ile MU 145 suşundan ayrılmaktadır.

Bu suşların taşıdıkları özelliklerine bakıldığında ise MU 145 suşunun arabinoz, mannoz ve N-asetil glukozamin testleriyle MU 67 suşundan farklı olduğu, enzim testlerinde ise bu suşların tripsin,  $\alpha$ -kimotripsin ve N-asetil- $\beta$ -glukozamin farklılık gösterdiği tespit edilmiştir. Fakat bu suşların antibiyotik gruplarında farklı duyarlılıklar gösterdiği tespit edilmiş, MU 67 suşunun MU 145 suşundan farklı olarak penisilin, aminoglikozid ve kinolon grubu antibiyotiklere dirençli olduğu görülmüştür. Her iki suşta plazmid tespit edilemezken, MU 145 suşunun MU 67 suşundan farklı olarak kurşuna dirençli olduğu saptanmıştır.

*M.mesophilicum* MU 140 ve MU 141 suşlarında protein bantlarına ve dendrogramlarına bakıldığında benzer bir protein profiline sahip oldukları tespit edilmiştir. Bu iki suşun 66.2 – 45 kDa'luk marker bantları arasında ortak 2 dominant protein taşıdıkları ve 35 kDa marker bantıyla aynı hizada ortak bantları olduğu görülmüştür. Bu iki suş arasında protein bantları açısından ayrılan nokta MU 140 suşunun 116- 66.2 kDa aralığındaki bantlarının daha net olması olarak tespit edilmiştir.

*M.mesophilicum* MU 140 ve MU 141 suşlarının protein bantlarında görülen bu yüksek orandaki benzerlik bu suşların diğer özelliklerinde de tespit edilmiştir. API 20 NE testinde yapılan biyokimyasal testlerin arabinoz dışında tümü bu suşlarda aynı sonuçları vermiştir. Enzim testi sonuçlarında da bu suşların genel olarak çalışmada kullanılan *Pseudomonas* türlerine ait suşlarla benzer sonuçlar göstermeleri yanı sıra kendi aralarında da alkalın fosfataz ve asit fosfotaz enzimleri dışında aynı



aynı enzimleri ürettikleri görülmüştür. Antibiyotiklere genellikle duyarlı bulunmalarının yanı sıra ağır metalleri yüksek oranda tolere etme yeteneğinde oldukları görülmüştür. Suşların kendi aralarında değerlendirildiklerinde *M.mesophilicum* MU 140 suşunun seftazidim, aztreonam ve kloramfenikol dışındaki çalışılan antibiyotiklere duyarlı olduğu ancak krom hariç tüm ağır metallere dirençli olduğu görülmüştür. *M.mesophilicum* MU 141 suşunun ise da antibiyotiklere karşı MU 140 suşuna benzer bir duyarlılık gösterdiği ve nikel ve civa dışındaki metallere karşı dirençli olduğu tespit edilmiştir. Plazmid çalışmalarında ise MU 141 suşunda 21.59 ve 11.61 kb büyüklüğünde iki plazmid tespit edilirken, MU 140 suşunun plazmid taşımadığı görülmüştür.

*S.maltophilia* suşlarının toplam hücre protein profilleri Şekil 10'da ve bu suşlara ait dendrogram ise Şekil 11'de verilmiştir. Bu şekilde de protein bantlarının tür içi suşları gruplandığı görülmektedir. Tüm bantları aynı olmamakla birlikte birbirine çok yakın bant yapısı taşıyan 4 farklı protein profil yapısı tespit edilmiştir. Bu suşlardan MU 23, MU 25, MU 52, MU 63, MU 64, MU 69 ve MU 137 suşlarının 116 kDa'luk marker üzerinde iki adet ortak dominant bantlar taşıdıkları görülmüştür. Ayrıca tüm suşların MU 53 ve MU 94 suşlarında dominant olmamakla birlikte 66.2 kDa marker hizasında ortak protein bantları olduğu tespit edilmiştir. Yine aynı şekilde MU 53 ve MU 94 suşları dışındaki tüm suşların 25 kDa markerla aynı mesafede dominant bantlar taşıdıkları tespit edilmiştir. Bu iki suş arasındaki yakın benzerlik dendrogramlarında da görülmüştür. *S.maltophilia* suşları taşıdıkları protein bantlarına göre genel olarak gruplandırılmış olsada bu gruplar içinde benzer özellik taşıyan suşlarda tespit edilmiştir. Örneğin *S.maltophilia* MU 25 suşu ile MU 52 suşunun protein bantlarının diğer suşlara göre birbirine daha fazla benzediği görülmüş ve bunun doğruluğu bu suşların protein bantlarına bağlı olarak çizilen dendrogramda da görülmüştür.

*S.maltophilia* MU 23 ve MU 99 suşlarıyla MU 64 ve MU 137 suşlarında protein bantlarına bağlı olarak yakın benzerlik göstermişlerdir. Bu suşların kendi aralarında göstermiş oldukları bu benzerlik 66.2 kDa ve 25 kDa'luk dominant bantlarının aynı hizada olmasıyla bağlantılı olarak dendrogramlarında da

görülmektedir. Ayrıca MU 69 suşunun *S.maltophilia* MU 23 ve MU 99 suşlarıyla da ilişkili olduğu görülmüştür.

*S.maltophilia* MU 25 ve MU 52 suşlarının benzer protein bantları taşımaları ve dendrogramlarında görüldüğü gibi yakın benzerlik göstermelerine paralel olarak, biyokimyasal ve enzim testleri yanı sıra antibiyotik ve metal duyarlılıklarında aynı sonuçları verdikleri görülmüştür. Ancak protein profili bu suşlarla çok benzer olan ve birçok ortak bant taşıyan *S.maltophilia* MU 63 suşunun biyokimyasal testleri, antibiyotik ve ağır metal duyarlılıkları bu suşlarla aynı sonuçları verse de enzim testlerinde farklı sonuçlar alınmıştır.

Çalışılan *S.maltophilia* MU 94 ve MU 99 suşlarında farklı protein bantları taşımaları yanı sıra yapılan testlerin hemen hepsine aynı sonuçları vermişlerdir. Ayrıca plazmid taşıyan *S.maltophilia* MU 52, MU 63 ve MU 69 suşlarının ortak protein bantları taşımaları dikkat çekicidir.

Çalışılan suşlar içinde farklı protein profili gösteren suşlardan birisi de *S.maltophilia* MU 136 suşu olup bu suşun protein bantlarına ve dendrogramına bakıldığında bu suşun *S.maltophilia* MU 53 ve MU 94 ile ilişkili olduğu görülmüştür. Ancak bu suşun enzim testleri sonuçlarına göre *S.maltophilia* MU 69 suşu ile, antibiyotik testlerine göre *S.maltophilia* MU 94 suşu ile benzerlik gösterdiği, kroma karşı olan dirençliliği ile diğer *S.maltophilia* suşlarından ayrıldığı tespit edilmiştir.

Diğer yandan *S.maltophilia* MU 63, MU 64 ve MU 69 suşlarının protein bantlarında görülen farklılık yanı sıra dendrogramlarında da benzerlik göstermedikleri görülmüş olsada bu suşların yapılan testlere çok benzer sonuçlar verdikleri görülmüştür.

## 6. KAYNAKLAR

Abe, M. and Nakazawa, T. (1994) Characterization of hemolytic and antifungal substance, cepalycin from *Pseudomonas cepacia*. *Microbiol Immunol* 38, 1-9.

Allison, D.G. and Nolan, R.D. (1994) Influence of growth rate and nutrient limitation on monobactam production and peptidoglycan synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Basic Microbiol* 34, 217-224.

Anzai, Y., Kudo, Y. and Oyaizu, H. (1997) The phylogeny of the genera *Chryseomonas*, *Flavimonas*, and *Pseudomonas* supports synonymy of these three genera. *Int J Syst Bacteriol* 47, 249-251.

Aoki, M., Uehara, K., et al. (1991) An antimicrobial substance produced by *Pseudomonas cepacia* B5 against the bacterial wilt disease pathogen, *Pseudomonas solanacearum*. *Agric Biol Chem* 55, 715-722.

Assinder, S.J and Williams, P.A. (1990) The TOL plasmids : determinants of the catabolism of the toluene and the xylenes. *Adv Microb Physiol*, 31, 1-69.

Austin, B. and Goodfellow, M. (1979) *Pseudomonas mesophilica*, a new species of pink bacteria isolated from leaf surfaces. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 29, 373-378.

Bauer, A.W., Kirby, W.M.M., Sherris, J.C., Turck, M. (1966) Antibiotic susceptibility testing by a standart single test method. *Am J Clin Pathol* 45, 493-496.

Baumann, L., Baumann, P., Mandel, M and Allen, R.D. (1972) Taxonomy of aerobic marine eubacteria. *J. Bacteriol.* 110, 402-429.

Bilgehan, H. (1995) Ekim ve Kültür Yöntemleri. Klinik Mikrobiyolojik Tanı., Barış Yayınları, Fakülteler Kitabevi, İzmir, 117-132.

Bilgehan, H. (2000) Temel mikrobiyoloji ve bağışıklık bilimi. Barış Yayınları, Fakülteler Kitabevi, İzmir.

Bin, L., Knudsen, G.R. and Eschen, D.J. (1991) Influence of an antagonistic strain of *Pseudomonas fluorescens* on growth and ability of *Trichoderma harzianum* to colonize sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum* in soil. *Phytopathology*, 81, 994-1000.  
Bousfield and Green (1985) *Int J Syst Bacteriol* 35, 209.

Brenner, D.J., Fanning, G.R., Rake, A.V. and Johnson, K.E. (1969) Batch procedure for thermal elution of DNA from hydroxyapatite. *Anal. Biochem.* 28, 447-459.

Brooks, G.F., Butel, J.S. and Morse, S.A. (1998) *Medical Microbiology. Pseudomonas and Related Organisms*, Appleton&Lange, Stamford, Connecticut, p. 258-264.

Bryan, L.E. (1979) Resistance to antimicrobial agents : the general nature of the problem and the basis of the resistance. In *Pseudomonas aeruginosa*. Clinical manifestations of infection and current therapy. Academic Pres, New York, pp. 219-270.

Buchanan, R.E., Holt, J.G., Lessel, E.F. (1966) *Index Bergeyana*, Williams and Wilkins, Baltimore.

Bull, C.T., Weller, D.M., Thomashow, L.S. (1991) Relationship between root colonization and suppression of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* by *Pseudomonas fluorescens* strain 2-79. *Phytopathology*, 81, 954-959.

Bull, A.T., Goodfellow, M. and Slater, J.H. (1992) Biodiversity as a source of innovation in biotechnology. *Annu. Rev. Microbiol.* 46, 219-252.

Burkhead, K.D., Schisler, D.A. and Slininger, P.J. (1994) Pyrrolnitrin production by biological control agent *Pseudomonas cepacia* B37w in culture and in colonized wounds of potatoes. *Appl Environ Microbiol* 60, 2031-2039.

Busse, J. and Auling, G. (1988) Polyamine pattern as a chemotaxonomic marker within the *Proteobacteria*. *Syst. Appl. Microbiol.* 11, 1-8.

Carlson, C.A., Pierson, L.S., et al. (1983) *Pseudomonas stutzeri* and related species undergo natural transformation. *J. Bacteriol.* 153, 93-99.

Carlson, C.A., Steenbergen, S.M., Ingraham, J.L. (1984) Natural transformation of *Pseudomonas stutzeri* by plasmids that contain cloned fragments of chromosomal deoxyribonucleic acid, *Arch. Microbiol.* 140, 134-138.

Carric, L. and Berk, R.S. (1971) Membranous inclusions of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 106, 250-256.

Carson, L.A., Favero, M.S., et al. (1973) Morphological, biochemical and growth characteristics of *Pseudomonas cepacia* from distilled water. *Appl. Microbiol.* 25, 439-444.

Collier, L., Balows, A., and Susman, M. (1998) *Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections*. Ninth Ed. pp.195-231ve 1092-1108, Oxford University Press, London.

Collins, C.H., Lyne, P.M. and Grange, J.M. (1995) *Collins and Lyne's Microbiological Methods*, Seventh ed. Butterworth-Heinemann Ltd., Oxford, Great Britain.

Costas, M. (1990) Numerical analysis of sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoretic protein patterns for the classification, identification and typing of medically important bacteria. *Electrophoresis* 11, 382-391.

Cowan, S.T. (1965) Principles and practice of bacterial taxonomy – a forward look. *J. Gen. Microbiol.* 39, 148-159.

D'Amato, E.E., Taylor, R.H., Blannon, J.C. and Reasoner, D.J. (1991) Substrate profile systems for the identification of bacteria and yeasts by rapid and automated approaches. In : *Manual of Clinical Microbiology* ( Balows, A., Hausler, W.J.J., Herrmann, K.L., Isenberg, H.D. and Shadomy, H.J., Eds.), pp.128-136. American Society for Microbiology, Washington, DC.

Dance, D.A.B., Sanders, D., et al. (1995) *Burkholderia pseudomallei* and Indian plague-like illness. *Lancet* 346, 904-905.

De Ley J. and De Smedt J. (1975) Improvements of the membrane filter method for DNA-rRNA hybridization. *Antonie van Leeuwenhoek* 41, 287-307.

Demange, P., Wendenbaum, S. et al. (1986) Bacterial siderophores : structure of pyoverdins and related compounds. *Iron, Siderophores and Plant Diseases*, ed. Swinburne TR, Plenum Pres, New York, pp. 131-147.

De Vos, P. and De Ley, J. (1983) Intra and intergeneric similarities of *Pseudomonas* and *Xanthomonas* ribosomal ribonucleic acid cistrons. *International Journal of Systematic Bacteriology* 35, 169-184.

De Wachter, R., Huysmans, E. and Vandenberghe, A. (1985) 5S ribosomal RNA as a tool for studying evolution. In *Evolution of Prokaryotes*, ed. Schleifer, K.H. and Stackebrandt, E., pp. 115-141. Academic Press, London.

DeWeger, L., Jann, A.B., Jann, K. and Lugtenberg, B. (1987) Lipopolisaccharides of *Pseudomonas spp.* That stimulate plant growth composition and use for strain identification. *J.Bacteriol.* 169, 1441-1446.

Döhler, K., Huss, V.A.R. and Zumft, W.G. (1987) Transfer of *Pseudomonas perfectomarina* Baumann, Bowditch, Baumann and Beaman 1983 to *Pseudomonas stutzeri* (Lehmann and Neumann 1896) Sidjerius 1946. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 37,1-3.

Edwards, U, Rogall, T., Blöcker, H., Emde, M. and Böttger, E. (1989) Isolation and direct complete nucleotide determination of entire genes. Characterization of a gene coding for 16S ribosomal RNA. *Nucleic Acids Research* 17, 7843-7853.

Embley, T.M., Smida, J. and Stackebrandt, E. (1988) Reverse transcriptase sequencing of 16S ribosomal RNA from *Faenia rectivirgula*, *Pseudonocardia thermophila* and *Saccharopolyspora hirsuta*, three wall type IV actinomycetes which lack mycolic acids. *Journal of General Microbiology* 134,961-966.

Embley, T.M. and Stackebrandt, E. (1997) Species in practice : exploring uncultured prokaryote diversity in natural samples. In : *Species : The Units of Biodiversity* (Claridge, M.F., Dawah, H.A. and Wilson, M.R., Eds.), pp. 61-81. Chapman and Hall, London.

Fass, R.J. and Barnishan, J. (1980) In vitro susceptibilities of non-fermentative gram-negative bacilli other than *Pseudomonas aeruginosa* to 32 antimicrobial agents. *Rev Infect Dis* 2, 841-853.

Favero, M.S., Carson, L.A., et al. (1971) *Pseudomonas aeruginosa* : growth in distilled water in hospitals, *Science*, 173, 836-838.

Ferguson, G., Pollard, D.R., et al. (1980) The bacterial pigment from *Pseudomonas lemonnieri*. *J.Chem.Soc.Perkin.Trans. I* .8,1782-1787.

Foght, J.M., Westlake, D.W.S., Johnson, W.M. and Ridgway, H.F. (1996) Environmental gasoline-utilizing isolates and clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* are taxonomically indistinguishable by chemotaxonomic and molecular techniques. *Microbiology* 142, 2333-2340.

Fox, G.E., Wisotzkey, J.D. and Jurtshuk Jr., P. (1992) How close is close : 16S rRNA sequence identity may not be sufficient to guarantee species identity. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 42, 166-170.

Fowler, V.J., Ludwig, W., and Stackebrandt, E. (1985) Ribosomal nucleic acid cataloguing in bacterial systematics: the phylogeny of Actinomadura. In *Chemical Methods in Bacterial Systematics*, ed. Goodfellow, M. and Minnikin, D.E., pp.17-40. Academic Press, London.

Fuller, A.T., Mellows, G., et al. (1971) Pseudomonic acid: an antibiotic produced by *Pseudomonas fluorescens*. *Nature* 234,416-417.

Garrod, L.P. and Waterworth, P.M. (1969) Effect of medium composition on the apparent sensitivity of *Pseudomonas aeruginosa* to gentamicin. *J. Clin Pathol.* 22, 534-538.

Giamarellos-Bourboulis, E., Karnesisi, L., Giamarellou, H. (2002) Synergy of colistin with rifampin and trimethoprim/sulfamethoxazole on multidrug-resistant *Stenotrophomonas maltophilia*. *Diagn Microbiol and Infect Dis* 44, 259-263.

Gibbons, N.E., Pattee, K.B., Holt, J.G.(Eds.) (1981) *Supplement to Index Bergeyana*, Williams and Wilkins, Baltimore.

Goodfellow M. and O'Donnell A.G. (1993) Roots of bacterial systematics. In : *Handbook of New Bacterial Systematics* (Goodfellow M. and O'Dennell A.G., Eds.), pp.3-54. Academic Press Ltd., London.

Goodfellow, M., Manfio, G.P. and Chun, J.(1997) Towards a practical species concept for cultivable bacteria. In : *Species : the Units of Biodiversity* (Claridge, M.F. and Dawah, H.A., Eds.), pp. 25-59. Chapman and Hall, London.



Gottlieb, T. (1993) Hazards of bacterial contamination of blood products. *Anaesth Intensive Care* 21, 20-23.

Green, P.N. and Bousfield, I.J. (1983) Emendation of *Methylobacterium* (Patt, Cole and Hanson 1976) : *Methylobacterium rhodinum* (Heumann 1962) comb. nov. corrig; *Methylobacterium radiotolerans* (Ho and Iizula 1971) comb. nov. corrig; and *Methylobacterium mesophilicum* (Austin and Goodfellow 1979) comb.nov. *Int J Syst Bacteriol* 33, 875-877.

Green, P.N., Bousfield, I.J. and Hood, D. (1988) Three new *Methylobacterium* species. *Int J Syst Bacteriol* 38, 124-127.

Grimont, P.A.D., Popoff, M.Y., Grimont, F., Coynault, C. and Lemelin, M. (1980) Reproducibility and correlation study of three deoxyribonucleic acid hybridization procedures. *Curr. Microbiol.* 4, 325-330.

Gurusiddaiah, S., Weller, D.M. et al. (1986) Characterization of an antibiotic produced by a strain of *Pseudomonas fluorescens* inhibitory to *Gaeumannomyces graminis var tritici* and *Pythium sp.* *Antimicrob Agents Chemother* 29,488.

Harf, C. and Monteil, H. (1989) Pathogen microorganisms in environmental waters : a potential risk for human health. *Water Int* 14, 75-79.

Harrison, L., Teplow, D.B., et al. (1991) Pseudomycins, a family of novel peptides from *Pseudomonas syringae* possessing broad-spectrum antifungal activity. *J Gen Microbiol* 137, 2857-2865.

Hassen, A., Saidi, N., Cherif M., Boudabous, A. (1998) Effects of heavy metals on *Pseudomonas aeruginosa* and *Bacillus thuringiensis*. *Bioresource Technology* 65, 73-82.

Hayashida, S., Tanaka, S., et al. (1991) Isolation of anti-algal *P. stutzeri* strains and their lethal activity for *Chattonella antiqua*. *Agric Biol Chem* 55, 787-790.

Henriksen, S.D. (1978) Serotyping of bacteria. *Methods Microbiol.* 12, 1-13.

Heumann, W. (1962) Die Methodik der Kreuzung sternbildender Bakterien. *Biol.Zentralbl.* 81, 341-354.

Hill, D.S., Stein, J.I. et al. (1994) Cloning of genes involved in the synthesis of pyrrolnitrin from *Pseudomonas fluorescens* and role of pyrrolnitrin synthesis in biological control of plant disease. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 78-85.

Hoffman, H.P., Geftic, S.C., et al. (1973) Mesosomes in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 114, 434-438.

Holloway, B.W., Dharmstithi, S., et al. (1990) Chromosome organization in *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas* : *Biotransformations, Pathogenesis and Evolving Biotechnology*, eds. Siver, S., Chakrabarty, A.M. et al. *American Society for Microbiology*, Washington, DC, pp 269-278.

Holloway, B.W. and Carey, E. (1993) *Pseudomonas aeruginosa* PAO, *Genetic Maps, Locus Maps of Complex Genomes*, 6th edn, ed. O'Brien, S.J. Cold Spring Harbor Laboratory Pres, Cold Spring Harbor, NY, pp. 98-105.

Holmes, B., Owen, R.J. et al. (1977) *Pseudomonas paucimobilis*, a new species isolated from human clinical specimens, the hospital environment, and other sources. *Int J Syst Bacteriol* 27, 133-146.

Holmes, B., Steigerwalt, A.G., Weaver, R.E. and Brenner, D.J. (1987) *Chryseomonas luteola* comb.nov. and *Flavimonas oryzihabitans* gen. nov., comb.

nov., *Pseudomonas*-like species from human clinical specimens and formerly known, respectively, as groups Ve-1 and Ve-2. *Int J Syst Bacteriol* 37, 245-250.

Holt, J.G., Krieg, N.R., Sneath, P.H.A., Staley, J.T. and Williams, S.T. (1994) *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 9th ed., pp.71-101. Williams and Wilkins, Baltimore, Maryland, USA.

Hori, K., Soga, K. and Doi, Y. (1994) Effects of culture conditions on molecular weights of poly(3-hydroxyalkanoates) produced by *Pseudomonas putida* from octanoate. *Biotechnol Lett*, 16, 709-714.

Hori, H., Takabayashi, K. et al. (1996) Gene cloning and characterization of *Pseudomonas putida* L-methionine-alpha-deamino-gamma-mercaptomethane-lyase. *Cancer Res* 56, 2116-2122.

Huijberts, G.N.M., Eggink, G. et al. (1992) *Pseudomonas putida* KT2442 cultivated on glucose accumulates poly(3-hydroxyalkanoates) consisting of saturated and unsaturated monomers. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 536-544.

Imanaka, H., Kousaka, M. et al. (1965) Studies on pyrrolnitrin, a new antibiotic. II. Taxonomic studies on pyrrolnitrin producing strains. *J Antibiot*, 18, 205-206.

Isenberg, H.D., Alperstein, P. and France, K. (1999) In vitro activity of ciprofloxacin, levofloxacin, trovafloxacin alone and combination with  $\beta$ -lactams, against clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*, *Stenotrophomonas maltophilia*, and *Burkholderia cepacia*. *Diagn Microbiol Infect Dis* 33, 81-86.

Jackman, P.J.H. (1985) Bacterial taxonomy based on electrophoretic whole-cell protein patterns. In : *Chemical Methods in Bacterial Systematics* (Goodfellow, M. and Minnikin, D.E. Eds.), pp.115-129. Academic Press : London.

Jackman, P.J.H. (1987) Microbial systematics based on electrophoretic whole-cell protein patterns. *Methods in Microbiology* 19,209-225.

Jacoby, G.A. and Shapiro, J.A. (1977) Plasmids studied in *Pseudomonas aeruginosa* and other pseudomonads. In : *DNA insertion elements, plasmids and episomes* (Bukhari, Shapiro and Adhya, eds.) Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, pp. 639-656.

Jain, K.C. and Whalley, W.B. (1980) The bacterial pigment from *Pseudomonas lemonnieri*. *J.Chem.Soc.Perkin.Trans. I* .8, 1788-1794.

Johnson, J.L. (1973) Use of nucleic acid homologies in the taxonomy of anaerobic bacteria. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 23, 308-315.

Johnson, J.L. (1985) DNA reassociation and RNA hybridization of bacterial nucleic acids. In : *Methods in Microbiology*, ed. Gottschalk, G., pp.33-77. Academic Press, London.

Johnson, J.L. (1989) Nucleic acids in bacterial classification. In : *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. 4 (Williams, S.T., Sharpe, M.E. and Holt, J.G.,Eds.), pp. 2303-2305. Williams and Wilkins, Baltimore, MD.

Kampfer, P. (1998) Some chemotaxonomic and physiological properties of the genus *Sphaerotilus*. *Syst. Appl. Microbiol.* 21,245-250.

Karlowsky, J.A., Kelly, L.J., Thornsberry, C., Jones, M.E., Evangelista, A.T., Critchley, I.A. and Sahn, D.F. (2002) Susceptibility to fluoroquinolones among commonly isolated Gram-negative bacilli in 2000: TRUST and TSN data for the United States. *International Journal of Antimicrobial Agents* 19, 21-31.

Karrer, P. and Jucker, E. (1950) *Carotenoids*. Elsevier Publishing Comp. Inc., London.

Kerstens, K. and De Ley, J. (1980) Classification and identification of bacteria by electrophoresis of their proteins. In : *Microbiological Classification and Identification* (Goodfellow, M. and Board, R.G., Eds.), pp273-279. Academic Press, London.

Kerstens, K. (1985) Numerical methods in the classification of bacteria by protein electrophoresis. In : *Computer-assisted Bacterial Systematics* (Goodfellow, M., Jones, D. and Priest, F.G., Eds), pp. 337-368. Academic Press, London.

Khardori, N., Elting, L., Wong, E., Schable, B. and Bodey, G.P. (1990) Nosocomial infections due to *Xanthomonas maltophilia* (*Pseudomonas maltophilia*) in patients with cancer. *Rev Infect Dis* 12, 997-1003.

Kieser, T. (1984) Factors affecting the isolation CCC DNA from *Streptomyces lividans* and *Escherichia coli*. *Plasmid* 12, 19-36.

Kim, Y.S. and Kim, E.J. (1994) A plasmid responsible for malonate assimilation in *Pseudomonas fluorescens*, *Plasmid* 32,219-221.

King, E.O., Ward, M.K. and Raney, D.E. (1954) Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. *J.Lab.Clin.Med.* 44, 301-307.

King, A. and Philips, I. (1978) The identification of pseudomonads and related bacteria in a clinical laboratory. *J Med Microbiol* 11, 165-176.

Kodama, K., Kimura, N. and Komagata, K. (1985) Two new species of *Pseudomonas* : *P.oryzihabitans* isolated from rice paddy and clinical specimens and *P.luteola* isolated from clinical specimens. *Int J Syst Bacteriol* 35,467-474.

Krieg, N.R. (1988) Bacterial classification : an overview. *Can. J. Microbiol.* 34, 536-540.

Krueger, T.S., Clark, E.A., Nix, D.E. (2001) In vitro susceptibility of *Stenotrophomonas maltophilia* to various antimicrobial combinations. *Diagn Microbiol Infect Dis* 41,71-78.

Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* (London) 227, 680-685.

Lane, D.A., Stahl, D.A., Olsen, G.J., Heller, D.J. and Pace, N.R. (1985) Phylogenetic analysis of the genera *Thiobacillus* and *Thiomicrospira* by 5S rRNA sequences. *Journal of Bacteriology* 163, 75-81.

Lee, K.Y., Wahl, R. and Barbu, E. (1956) Contenu en bases purique et pyrimidiques des acides deoxyribonucleiques des bacteries. *Ann.Inst.Pasteur* 91, 212-224.

Lee, C., Kim, S. et al. (1994) Cepacidine A, a novel antifungal antibiotic produced by *Pseudomonas cepacia*. I Taxonomy, production, isolation and biological activity. *J Antibiot*, 47, 1402-1407.

Leifson, E. (1962) The bacterial flora in distilled and stored water. III. New species of the genera *Corynebacterium*, *Flavobacterium*, *Spirillum* and *Pseudomonas*. *Int.Bull.Bacteriol.Nomencl. Taxon.* 12, 161-170.

Lim, Y., Suh, J., et al. (1994) Cepacidine A, a novel antifungal antibiotic produced by *Pseudomonas cepacia*. II. Physico-chemical properties and structure elucidation. *J Antibiot*, 47, 1406-1416.

Logan, N.A. (1994) *Bacterial Systematics*. Blackwell Scientific Publications, London.

Lowbury, E.J.L., Lilly, H.A., Kidson, A., Ayliffe, G.A.J and Jones, R.J. (1969) Sensitivity of *Pseudomonas aeruginosa* to antibiotics : emergence of strains highly resistant to carbenicillin. *Lancet* 1969, 448-452.

Ludwig, W. and Schleifer K.H. (1994) Bacterial phylogeny based on 16S and 23S rRNA sequence analysis. *FEMS Microbiol. Rev.* 15, 155-173.

Lugtenberg, J.J. and De Weger, L.A. (1992) Plant root colonization by *Pseudomonas* spp., *Pseudomonas. Molecular Biology and Biotechnology*, (Gali, E., Silver, S., Witholt, B. eds), American Society for Microbiology, Washington, DC, pp. 13-19.

Machan, Z.A., Taylor, G.W., et al. (1992) 2-heptyl-4-hydroxyquinoline *N*-oxide, an antistaphylococcal agent produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob Chemother* 30, 615-623.

Magee, J. (1993) Whole organism fingerprinting. In : *Handbook of New Bacterial Systematics* (Goodfellow, M. and O'Donnell, A.G., Eds.) Academic Press Ltd., London.

Martinez-Murcia, A.J., Benloch, S. and Collins, M.D. (1992) Phylogenetic interrelationships of members of the genera *Aeromonas* and *Plesiomonas* as determined by 16S ribosomal DNA sequencing : lack of congruence with result of DNA-DNA hybridizations. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 42, 412-421.

Mathias, R.G., Ronald, A.R., Garwith, M.J., McCullough, D.V., Stiver, H.G., Berger, J., Cates, C.Y., Fox, L.M. and Lonk, B.A. (1976) Clinical evaluation of amikacin in treatment of infections due to Gram-negative aerobic bacilli. *J Infect Dis* 134, Suppl. 394-401.

Mercado, T.I., Butany, J.W. and Ferrans, V.J. (1986) *Trypanosoma cruzi* : ultrastructural changes produced by an anti-trypanosomal factor from *Pseudomonas fluorescens*. *Exp Parasitol* 61, 65-75.

Meyer, J.M., Hohnadel, D. et al. (1990) Pyoverdinin-facilitated iron uptake in *Pseudomonas aeruginosa*: immunological characterization of the ferripyoverdinin receptor. *Mol Microbiol*, 4, 1401-1405.

Miranda, C.D. and Zemelman, R. (2002) Antimicrobial multiresistance in bacteria isolated from fresh-water Chilean salmon farms. *The Science of the Total Environment* 293, 207-218.

Mitchell, R.D. and Hayward, A.C. (1966) Postoperative urinary tract infections caused by contaminated irrigating fluid. *Lancet* 1, 793-795.

Monteil, H., Harf, C., Meunier, O., Jehl, V. (1992) *Xanthomonas maltophilia* : bacterie opportuniste. *Rev Fr Lab* 236, 22-26.

Monteil, H. and Monteil, C.H. (1997) Aerobic gram negative bacilli : newer nosocomial pathogens. *International Journal of Antimicrobial Agents* 8, 217-231.

NCCLS, National Committee for Clinical Laboratory Standards (1999) Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, 9th ed, Ninth Informational Supplement M 100-S9, Wayne Pa.

Nieto, J.J., Fernandez-Castillo, R., Marquez, M.C., et al. (1989) Survey of metal tolerance in moderately halophilic eubacteria. *Appl Environ Microbiol* Sept, 2385-2390.

Olsen, G.J., Woese, C.R. and Overbeek, R. (1994) The winds of (evolutionary) change : breathing new life into microbiology. *J.Bacteriol.* 176, 1-6.



Owen, R.J. and Jackman, P.J.H. (1982) The similarities between *Pseudomonas paucimobilis* and allied bacteria derived from analysis of deoxyribonucleic acids and electrophoretic protein patterns. *J.Gen. Microbiol.* 128, 2945-2954.

Oyaizu, H. and Komagata, K. (1983) Grouping of *Pseudomonas* species on the basis of cellular fatty acid composition and the quinone system with special reference to the existence of 3-hydroxy fatty acids. *Journal of General and Applied Microbiology* 29, 17-40.

Palleroni, N.J., Doudoroff, M., Stanier, R.Y., Solanes, R.Y. and Mandel, M. (1970) Taxonomy of the aerobic pseudomonads : the properties of the *Pseudomonas stutzeri* group. *J Gen. Microbiol.* 60, 215-231.

Palleroni, N.J. and Doudoroff, M. (1972) Some properties and taxonomic subdivisions of the genus *Pseudomonas*. *Annu. Rev. Phytopathol.* 10, 73-100.

Palleroni, N.J., Kunisawa, R., Contopoulou, R., Doudoroff, M. (1973) Nucleic acid homologies in the genus *Pseudomonas*. *International Journal of Systematic Bacteriology* 23, 333-339.

Palleroni, N.J. (1980) Isolation and properties of a new hydrogen bacterium related to *Pseudomonas saccharophila*. *J.Gen.Microbiol.* 117, 155-161.

Palleroni, N.J. (1984) *Pseudomonas* Migula 1894. In : *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (Krieg, N.R., Holt, J.G., Eds.), Vol.1, pp.140-223. Lippincott Williams and Wilkins, Baltimore, USA.

Palleroni, N.J. and Bradbury, J.F. (1993) *Stenothrophomonas*, a new bacterial genus for *Xanthomonas maltophilia* (Hugh 1980). *Int J Syst Bacteriol* 43, 606-609.

Palleroni, N.J. (1993a) *Pseudomonas* classification. A new case history in the taxonomy of Gram negative bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek, J. Microbiol*, 64, 231-251.

Phillips, I., Curtis, M.A. and Snell, J.J.S. (1971) *Pseudomonas cepacia* septicemia in an intensive-care unit. *Lancet* 1,375-377.

Pierson, L.S.I., Keppenne, V.D. and Wood, D.W. (1994) Phenazine antibiotic biosynthesis in *Pseudomonas aureofaciens* 30-84 is regulated by PhzR in response to cell density. *J Bacteriol* 176, 3966-3974.

Pot, B., Vandamme, P. and Kersters, K. (1994) Analysis of Electrophoretic Whole-Organism Protein Fingerprints. In : *Chemical Methods in Prokaryotic Systematics* (Goodfellow, M. and O'Donnell, A.G., Eds.), pp.493-521. John Wiley and Sons Ltd. West Sussex, England.

Rastogi, S. and Sperber, S.J. (1998) Facial cellulitis and *Pseudomonas luteola* bacteremia in an otherwise healthy patient. *Diagn Microbiol Infect Dis* 32, 303-305.

Richau, J.A., Choquenot, D., Fialho, A.M., Moreira, L.M. and Sa-Correia, I. (1997) The biosynthesis of the exopolysaccharide gellan results in the decrease of *S. paucimobilis* tolerance copper. *Enzyme Microb Technol* 2, 510-516.

Robers, L.A., Collignon, P.J., et al. (1990) An Australia-wide epidemic of *Pseudomonas pickettii* bacteraemia due to contaminated 'sterile' water for injection. *Med. J. Aust.* 152, 652-655.

Robin, T. and Janda, J.M. (1996) *Pseudo-, Xantho-, Stenothrophomonas maltophilia* : an emerging pathogen in search of a genus. *Clin Microbiol News* 18, 9-13.

Rolston, K.V., Messer, M, and Ho, D.H. (1990) Comparative in vivo activities of newer quinolones against *Pseudomonas* species and *Xanthomonas maltophilia* isolated from patients with cancer. *Antimicrob Agents Chemother* 34, 1812-1813.

Rosbach, S., Wilson, T.L., Kukuk, M.L., Carty, H.A. (2000) Elevated zinc induces siderophore biosynthesis genes and a *zntA*-like gene in *P.fluorescens*. *FEMS Microbiol Lett* 191, 61-70.

Rossello-Mora, R.A., Garcia-Valdes, E., Macario, A.J.L., Lalucat, J. and Conway de Macario, E. (1992) Antigenic diversity of *Pseudomonas stutzeri*. *Syst. Appl. Microbiol.* 15, 617-623.

Rossello-Mora, R.A., Lalucat, J., Dott, W. and Kampfer, P. (1994) Biochemical and chemotaxonomic characterization of *Pseudomonas stutzeri* genomovars. *J.Appl.Bacteriol.* 76, 226-233.

Rossello-Mora, R. ve Amann, R. (2001) The species concept for prokaryotes. *FEMS Microbiology Reviews* 25, 39-67.

Römling, U. and Tümmler, B. (1992) *PacI* / *SwaI* map of the *Pseudomonas aeruginosa* PAO chromosome. *Electrophoresis* 13, 649-651.

Sands, D.C. and Rovira, A.D. (1971) *Pseudomonas fluorescens* biotype G, the dominant fluorescent pseudomonad in South Australian soils and wheat rhizospheres. *J.Appl.Bacteriol.* 34, 261-275.

Schleifer, K.H. and Kandler, O. (1972) Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications. *Bacteriol.Rev.* 36, 143-187.

Schlegel, H.G. (1999) Deutsche Akademie der Naturforscher Leopoldina, Vol. 28, Halle.

Schlegel, H.G. ve Köhler, W. (1999) Bacteriology paved the way to cell biology : a historical account. In : *Biology of the Prokaryotes* (Lengeler, J.W., Drews, G. and Schlegel, H.G., Eds) Thieme, Stuttgart.

Selander, R.K., Caugent, D.A., Ochman, H., Musser, J.M., Gilmour, M.N. and Whittam, T.S. (1986) Methods of multilocus enzyme electrophoresis for bacterial population genetics and systematics. *Appl. Environ. Microbiol.* 51, 873-884.

Sherris, J.C., Preston, N.W. and Shoosmith, J.G. (1957) The influence of oxygen on the motility of a strain of *Pseudomonas spp.* *J. Gen. Microbiol.* 16, 86-96.

Shibl, A.M., Tawfik, A.F. and Ramadan, M.A. (1997) Comparative efficacy of successive exposure of *Pseudomonas aeruginosa* to gentamicin and ceftazidime, *International Journal of Antimicrobial Agents* 8, 257-261.

Siverio, F., Cambra, M., Gorris, M.T., Corzo, J. and Lopez, M.M. (1993) Lipopolysaccharides as determinants of serological variability in *Pseudomonas corrugata*. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 1805-1812.

Skerman, V.B.D., McGowan, V. and Sneath, P.H.A. (1980) *Approved Lists of Bacterial Names.* *Int. J. Syst. Bacteriol* 30, 225-420.

Smibert, R.M. ve Krieg, N.R. (1994) Phenotypic characterization. In : *Methods for General and Molecular Bacteriology* (Gerhardt, P., Murray, R.G.E., Wood, W.A. and Krieg, N.R., Eds.), pp.607-654. American Society for Microbiology, Washington, DC.

Sneath, P.H.A. (1977) The maintenance of large numbers of strains of microorganisms and the implications for culture collections. *FEMS Microbiol. Lett.* 1, 333-334.

Sneath, P.H.A. (1989) Numerical taxonomy. In : *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. 4 (Williams, S.T., Sharpe, M.E. and Holt, J.G., Eds.), pp. 2303-2305. Williams and Wilkins, Baltimore, MD.

Speciale, A., Musumeci, R., Blandino, G., Caccamo, F., Siracusa, V. and Renis, M. (2000) Molecular mechanisms of resistance in *Pseudomonas aeruginosa* to fluoroquinolones. *International Journal of Antimicrobial Agents* 14, 151-156.

Stackebrandt, E., Ludwig, W. and Fox, G.E. (1985) 16S ribosomal RNA oligonucleotide cataloging. *Methods Microbiol.* 18, 75-107.

Staley, J.T. ve Krieg N.R. (1984) Classification of procaryotic organisms : an overview. In : *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. 4 (Williams, S.T., Sharpe, M.E. and Holt, J.G., Eds.), pp. 2299-2302. Williams and Wilkins, Baltimore, MD.

Stanier, R.Y., Palleroni, N.J. and Doudoroff, M. (1966) The aerobic pseudomonads : a taxonomic study. *J Gen Microbiol* 43, 159-271.

Stephenson, M. (1930) *Bacterial metabolism*, 1st edn. Longmans, Green and Co., London.

Suzuki, K., Goodfellow, M. and O'Donnell, A.G. (1993) Cell envelopes and classification. In : *Handbook of New Bacterial Systematics* (Goodfellow, M. and O'Donnell, A.G., Eds.), pp. 195-250. Academic Press Ltd., London.

Swings, J., De Vos, P., Van den Mooter, M., De Ley, D. (1983) Transfer of *Pseudomonas maltophilia* (Hugh 1981) to the genus *Xanthomonas maltophilia* (Hugh 1981) comb. nov. *Int J Syst Bacteriol* 33, 409-413.

Sykes, R.B. and Richmond, M.H. (1970) Intergeneric transfer of a beta lactamase gene between *P.aeruginosa* and *E.coli*. *Nature* 226, 952-954.

Tamaoka, J. (1994) Determination of DNA base composition. In : *Chemical Methods in Prokaryotic Systematics* (Goodfellow, M. and O'Donnell, A.G., Eds.), pp.463-469. John Wiley and Sons Ltd. West Sussex, England.

Tangaromsuk, J., Pokethitiyook, P., Kruatrachue, M., Upatham, E.S. (2002) Cadmium biosorption by *Sphingomonas paucimobilis* biomass. *Bioresource Technology* 85, 103-105.

Töreci, K. (1981) *Pseudomonas aeruginosa*'nın bakteriyolojik tanısı. 2.Ulusal Kükem Kongresi, 51-65.

Trüper, H.G. and Schleifer, K.H. (1992) Prokaryote characterization and identification. In : *The Prokaryotes*. Second Edition, Vol. 1 (Balows, A., Trüper, H.G., Dworkin, M., Harder, W. and Schleifer, K.H., Eds.), pp. 126-148. Springer-Verlag, Berlin.

Uğur, A. and Ceylan, Ö. (2003) Occurrence of resistance to antibiotics, metals, and plasmids in clinical strains of *Staphylococcus* spp. *Archives of Medical Research* 34, 130-136.

Upadhyay, R.S., Visintin, L., Jayaswal, R.K. (1991) Environmental factors affecting the antagonism of *Pseudomonas cepacia* against *Trichoderma viride*. *Can J Microbiol.* 37, 880-884.

Upadhyay, R.S. and Jayaswal, R.K. (1992) *Pseudomonas cepacia* causes mycelial deformities and inhibition of conidiation in phytopathogenic fungi. *Curr Microbiol* 24, 181-187.

Uragami, T. and Komogata, K. (1984) *Protomonas*, a new genus of facultatively methylotrophic bacteria. *Int J Syst Bacteriol* 34, 188-201.

Van Niel C.B. and Allen M.B. (1952) A note on *Pseudomonas stutzeri*. *J. Bacteriol.* 64, 413-422.

Van Zyl, E. and Steyn, P.L. (1992) Reinterpretation of the taxonomic position of *Xanthomonas maltophilia* and taxonomic criteria in this genus request for an opinion. *Int J Syst Bacteriol* 42, 193-198.

Vandamme, P., Pot, B., Gillis, M., De Vos, P. and Swings, J. (1996) Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiol. Rev.* 60, 407-438.

Vandamme, P., Gillis, M., De Vos, P. and Swings, J. (1998) *Pelistega europaea* gen. Nov., sp. nov., a bacterium associated with respiratory disease in pigeons taxonomic structure and phylogenetic allocation. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 48, 431-440.

Vasil, M.L. (1981) *Pseudomonas aeruginosa*: Biology, mechanism, virulence, epidemiology. *J. Pediatr.* 108(5), 800-805.

Vauterin, L., Swings, J. and Kersters, K. (1991) Grouping of *Xanthomonas campestris* pathovars by SDS-PAGE of proteins. *J. Gen. Microbiol.* 137, 1677-1687.

Vauterin, L., Swings, J. and Kersters, K. (1993) Protein electrophoresis and classification. In: *Handbook of New Bacterial Systematics* (Goodfellow, M. and O'Donnell, A.G. Eds.), pp. 241-280. Academic Press, London.

Von Graevenitz, A. (1985) Ecology, clinical significance and antimicrobial susceptibility of infrequently encountered glucose-nonfermenting gram-negative rods. *Nonfermentative Gram-negative Rods. Laboratory Identification and Clinical Aspects*, ed. Gilardi, G.L., Marcel Dekker, New York, 181-232.

Walsh, D.M. and Eberiel, D.T. (1986) *Pseudomonas cepacia* isolated from crystal violet solution in a hospital laboratory. *J.Clin.Microbiol.* 23, 962.

Washington, J.A. and Sutter, V.L. (1980) Dilution susceptibility test: agar and macro-broth dilution procedures. In : *Manual of Clinical Microbiology*, 3<sup>rd</sup> edn, ed. Lennette, E.H., Balows, A., Hausler, W.J. and Truant, J.P. pp. 453-458. Washington, DC: American Society for Microbiology.

Wayne, L.G. (1987) Report of the Ad Hoc Committee on reconciliation of approaches to Bacterial Systematics. *Int. J. Syst.Bacteriol.* 37, 463-464.

Wendenbaum, S., Demange, P., et al. (1983) The structure of pyoverdine Pa, the siderophore of *Pseudomonas aeruginosa*, *Tetrahedron Lett.* 24,4877-4880.

Wheelis, M.L., Kandler, O. and Woese, C.R. (1992) On the nature of global classification. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 2930-2934.

Wilkinson, S.G., Galbraith, L. and Lightfoot, G.A. (1973) Cell walls, lipids and lipopolysaccharides of *Pseudomonas* species. *Eur J Biochem* 33, 158-174.

Willems, A., De Vos, P., Gillis, M. and Kersters, K. (1992) Towards an Improved Classification of *Pseudomonas*. In : *Identification Methods in Applied and Environmental Microbiology* (Board, R.G., Jones, D. and Skinner, F.A.), pp.21-43, Blackwell Scientific Publications, Oxford.

Williams, J.G.K., Kubelic, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A. and Tingey, S.V. (1990) DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* 18,6532-6535.

Williams, S.T., Sharpe, M.E. and Holt, J.G., Eds. (1989) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. 4 (pp. 2299-2302. Williams and Wilkins, Baltimore, MD.



Woese C.R., Blanz, P. and Hahn, C.M. (1984) What isn't a pseudomonad : the importance of nomenclature in bacterial classification. *Systematic and Applied Microbiology* 5, 179-195.

Woese C.R. (1992) Prokaryote systematics : the evolution of a science. In : *The Prokaryotes*. Second Edition, Vol. 1 (Balows, A., Trüper, H.G., Dworkin, M., Harder, W. and Schleifer, K.H., Eds.), pp.3-18.

Yabuuchi, E. and Ohyama, A. (1972) Characterization of 'pyomelanin' producing strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Int. J.Syst.Bacteriol.* 22, 53-64.

Yabuuchi, E., Yano, I., Oyaizu, H., Hashimoto, Y., Ezaki, T., Yamamoto, H. (1990) Proposals of *Sphingomonas paucimobilis* gen. nov. and comb. nov., *Sphingomonas parapaucimobilis* sp. nov., *Sphingomonas yanoikuyae* sp. nov., *Sphingomonas adhaesiva* sp. nov., *Sphingomonas capsulata* comb. nov., and 2 genospecies of the genus *Sphingomonas*. *Microbiol Immunol* 34, 99-119.

Zimmermann, W. (1980) Penetration of beta lactam antibiotics into their target enzymes in *Pseudomonas aeruginosa* : comparison of a highly sensitive mutant with its parent strain . *Antimicrob Agents Chemother* 18, 94-100.

**KİŞİSEL BİLGİLER**

Adı Soyadı : Özgür CEYLAN

Doğum Yeri : Sultanhisar /Aydın

Doğum Yılı : 1975

**EĞİTİM VE AKADEMİK BİLGİLER**

Lise : 1991-1995 Kütahya Sağlık Meslek Lisesi, Kütahya

Lisans : 1995-2000 Biyoloji Bölümü, Muğla Üniversitesi, Muğla

Yabancı Dil : İngilizce

**MESLEKİ BİLGİLER**

2000-2002 Araştırma Görevlisi, Muğla Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi,  
Biyoloji Bölümü

2002- ..... Biyolog, Ortaca Devlet Hastanesi, Muğla.