

KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

78094



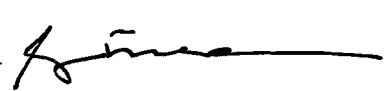
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI


FUEL OİL İLE KİRLENMİŞ TOPRAKLARDAN BAZI *PSEUDOMONAS*
TÜRLERİNİN İZOLASYONU VE KARAKTERİZASYONU

Biyolog İsmail DEMİR

Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsünde
"Yüksek Lisans (Biyoloji)"
Ünvanı Verilmesi İçin Kabul Edilen Tezdir

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 16. 02. 1998
Tezin Savunma Tarihi : 05. 02. 1998

Tez Danışmanı : Doç. Dr. Zihni DEMİRBAĞ 
Jüri Üyesi : Prof. Dr. Asım KADIOĞLU 
Jüri Üyesi : Doç. Dr. Saadettin GÜNER 

Enstitü Müdürü : Prof. Dr. Fazlı ASLAN 

78094

Trabzon 1998

ÖNSÖZ

Fuel oil ile kirlenmiş topraktan bazı *Pseudomonas* türlerinin izolasyonu ve karakterizasyonu konulu bu çalışma, Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı'nda "Yüksek Lisans Tezi" olarak hazırlanmıştır.

Yüksek lisans tez danışmanlığımı üstlenerek, gerek konu seçimi, gerekse çalışmaların yürütülmesi ve değerlendirilmesi sırasında ilgi ve yardımlarını esirgemeyen saygıdeğer hocam Doç. Dr. Zihni DEMİRBAĞ'a, değerli jüri üyesi hocalarıma, çalışmayı yapabilmem için her türlü laboratuvar imkanlarını kullanmamı sağlayan bölüm başkanımız sayın Prof. Dr. Osman BEYAZOĞLU'na ve çalışmalarım sırasında bana yardımcı olan diğer hocalarıma ve tüm Biyoloji Bölümü araştırma görevlisi arkadaşlarıma teşekkür ederim.

İsmail DEMİR

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
ÖNSÖZ.....	II
İÇİNDEKİLER.....	III
ÖZET.....	VII
SUMMARY.....	VIII
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	IX
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	X
SEMBOLLER ve KISALTMALAR DİZİNİ.....	XI
1. GENEL BİLGİLER.....	1
1.1. Giriş.....	1
1.2. Polisiklik Aromatik Hidrokarbonların Çevreye Bulaşmaları.....	2
1.3. Polisiklik Aromatik Hidrokarbonların Biyolojik ve Fiziksel Etkileri.....	4
1.4. Denize Dökülen Polisiklik Aromatik Hidrokarbonların Temizlenmesi.....	5
1.4.1. Polisiklik Aromatik Hidrokarbonların Mikrobiyal Parçalanması.....	5
1.4.2. Polisiklik Aromatik Hidrokarbonların Yıkımlarını Etkileyen Biyolojik Faktörler.....	6
1.5. Mikroorganizmaların Polisiklik Aromatik Hidrokarbonlara Adaptasyonu.....	8
1.5.1. Mikroorganizmaların Önceden Polisiklik Aromatik Hidrokarbonlara Maruz Kalmalarının Adaptasyondaki Rolü.....	8
1.5.2. Mikrobiyal Kommünitenin Genetik Kompozisyonunun Değişmesiyle Adaptasyon.....	8
1.5.3. Adaptasyonda Plazmidlerin Rolü.....	9
1.6. Bakteri Hücre Yapısı Hakkında Genel Bilgiler.....	10
1.7. <i>Pseudomonadaceae</i> Familyası.....	13
1.7.1. <i>Pseudomonas</i> Cinsi.....	14
1.7.2. Hücre Morfolojisi ve İnce Yapısı.....	15
1.7.3. Pigmentasyon.....	16
1.7.4. Plazmidler.....	17
1.7.5. Antibiyotik Duyarlılığı.....	18

1.8.	<i>Pseudomonas</i> 'ların Özel Karakterlerinin Test Edilmesi.....	19
1.8.1.	Besinsel ve Diğer Fiziksel Özelliklerin Taranması.....	19
1.8.2.	Pigment Oluşumu.....	20
1.8.3.	Poli- β -hidroksibutirat (PHB) Birikimi.....	20
1.8.4.	PHB Hidrolizi.....	21
1.8.5.	Testosteron Parçalanması.....	21
1.8.6.	Ring Füzyon Mekanizması.....	21
1.8.7.	Arjinin Hidrolizi.....	22
1.8.8.	Karbohidratlardan Asit Üretimi.....	22
1.8.9.	Tween 80 Hidrolizi.....	22
2.	YAPILAN ÇALIŞMALAR.....	23
2.1.	Materyaller.....	23
2.2.	Yöntem.....	23
2.2.1.	İzolatların Elde Edilmesi.....	23
2.2.1.1.	Toprak Örneklerinin Alınması ve Bakteri Sayılarının Belirlenmesi.....	23
2.2.1.2.	Farklı İzolatların Belirlenmesi ve Saf Kültürlerin Hazırlanması.....	24
2.2.2.	İzolatlardan <i>Pseudomonas</i> Cinsine Dahil Olanların Belirlenmesi.....	24
2.2.2.1.	<i>Pseudomonas</i> İzolasyon Agarda Büyüme.....	24
2.2.2.2.	Gram Boyama.....	24
2.2.2.3.	Katalaz Testi.....	25
2.2.2.4.	Pigmentasyon.....	25
2.2.3.	<i>Pseudomonas</i> Cinsine Dahil Olan İzolatların Çeşitli Boyama ve Morfolojik Özelliklerinin Belirlenmesi.....	25
2.2.3.1.	Basit Boyama.....	25
2.2.3.2.	Hareket Testleri.....	26
2.2.3.3.	İzolatların Boyutlarının Hesaplanması.....	26
2.2.4.	<i>Pseudomonas</i> Cinsine Dahil Olan İzolatların Fizyolojik Özelliklerinin Belirlenmesi.....	26
2.2.4.1.	İzolatların Büyüme Sıcaklıklarının Belirlenmesi.....	26
2.2.4.2.	İzolatların Büyüdüğü pH Aralıklarının Belirlenmesi.....	26
2.2.4.3.	İzolatların NaCl İhtiyaçlarının Belirlenmesi.....	27
2.2.4.4.	İzolatların Atmosferik Oksijen İhtiyaçlarının Belirlenmesi....	27

2.2.5.	<i>Pseudomonas</i> Cinsine Dahil Olan İzolatların Çeşitli Biyokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi.....	27
2.2.5.1.	Nişasta Hidrolizi Testi.....	27
2.2.5.2.	Jelatin Hidrolizi Testi.....	28
2.2.5.3.	Karbohidrat Fermentasyon Testleri.....	28
2.2.5.4.	Vogus-Proskauer Testi.....	28
2.2.5.5.	Sitrat ve Propionat Kullanım Testi.....	29
2.2.5.6.	Nitrata İndirgeme Testi.....	29
2.2.5.7.	Oksidaz Testi.....	29
2.2.5.8.	Tween 80 Hidrolizi.....	30
2.2.5.9.	Arjinin Hidrolizi.....	30
2.2.6.	İzolatların Polisiklik Aromatik Hidrokarbon (fenantren) Parçalama Özelliklerinin Belirlenmesi.....	30
2.2.7.	İzolatların Plazmid DNA'larının İzolasyonu.....	30
2.2.8.	İzolatların Toplam Hücre Protein Profillerinin Çıkarılması...32	
2.2.8.1.	Total Hücre Proteinlerinin İzolasyonu.....	32
2.2.8.2.	Protein Konsantrasyonunun Tayini.....	32
2.2.8.3.	SDS-Poliakrilamid Jel Elektroforezi.....	32
2.2.9.	Çeşitli Antibiyotiklerin İzolatlar Üzerindeki Etkilerinin Belirlenmesi.....	33
3.	BULGULAR.....	34
3.1.	Alınan Toprak Örneklerinin Kantitatif Analizi.....	34
3.2.	<i>Pseudomonas</i> Cinsine Ait Olan İzolatların Bazı Karakterlerinin Tayini.....	35
3.2.1.	Morfolojik Karakterler.....	35
3.2.2.	Fizyolojik Karakterler.....	37
3.2.3.	Biyokimyasal Karakterler.....	39
3.3.	İzolatların Polisiklik Aromatik Hidrokarbon Parçalayanlarının Belirlenmesi.....	40
3.4.	İzolatların Plazmid İçerikleri.....	40
3.5.	İzolatların Toplam Protein Profilleri.....	40
3.6.	Antibiyotik Duyarlılığı.....	42
4.	TARTIŞMA.....	45
5.	SONUÇLAR.....	49

6.	ÖNERİLER.....	50
7.	KAYNAKLAR.....	51
8.	EKLER.....	62
8.1.	Besiyeri, Ayıraç ve Boyaların Hazırlanışı.....	62
8.1.1.	Besiyerilerin Hazırlanışı.....	62
8.1.2.	Ayıraç ve Boyaların Hazırlanışı.....	63
9.	ÖZGEÇMİŞ.....	65



ÖZET

Petrol ve petrol türevi olan polisiklik aromatik hidrokarbon (PAH)'lar çeşitli yollarla çevreye bulaşan organik çevre kirleticileridir. Bunların çoğu, çevrede uzun süre kalmaları ve birikmeleri sonucu çevre kirlenmesine ve biyolojik dengenin bozulmasına sebep olurlar. Çevrenin polisiklik aromatik hidrokarbonlardan temizlenmesi, uygulamalı mikrobiyoloji açısından oldukça önemlidir.

PAH'ları parçalayan bakterilerin belirlenmesi, izolasyonu ve karakterizasyonu çevrenin daha kısa bir sürede temizlenmesi açısından büyük öneme sahiptir. Bu nedenle, bu çalışmada, fuel oil ile kirlenmiş bir sahadan alınan örneklerdeki PAH'ları parçalayan bakterilerin tespit edilmesi, bunlar arasından *Pseudomonas* cinsine ait olanların belirlenmesi, bunlardan plazmid içerenlerin ayırt edilmesi ve bu plazmidlerin biyolojik özelliklerinin belirlenmesi amaçlanmaktadır.

Farklı özelliklere sahip noktalardan alınan örneklerde toplam 45 farklı bakteriyal izolat tespit edildi. Bunlardan 6 tanesinin *Pseudomonas* cinsine dahil olduğu ve bu *Pseudomonas*'lardan da 4 tanesinin fenantren parçalama özelliğine sahip oldukları belirlendi. Bu *Pseudomonas* izolatlarının morfolojik, fizyolojik, biyokimyasal, kemotaksonomik ve moleküler karakterleri aydınlatıldı. Fenantren parçalama özelliğine sahip olan izolatların iki tanesinin plazmid içerdikleri tespit edildi. Bu plazmidlerin fenantren parçalamayla olan ilişkileri ve moleküler karakterizasyonları çalışıldı.

Anahtar Kelimeler: Polisiklik Aromatik Hidrokarbon, *Pseudomonas*, Biyodegradasyon

SUMMARY

Isolation and Characterisation of Some *Pseudomonas* Species from Soil Contaminated with Fuel Oil

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) which are petroleum and petroleum derivatives, are widespread organic pollutants entering the environment by various ways. Since most of these persist in the environment for long time and bioaccumulate, they cause environmental pollution. The cleaning of the environment from the polycyclic aromatic hydrocarbons is very important in applied microbiology.

Determination, isolation and characterisation of bacteria which participate in the biodegradation of PAHs have importance in the decontamination of the environment in shorter periods. Therefore, in the present study, we aimed to determine PAH decomposing bacteria from an environment contaminated with fuel oil, identify all of the bacteria which belongs to *Pseudomonas*, observe *Pseudomonas* which have plasmid and determine the biological features of these plasmids.

We identified 45 isolate in the studied samples, 6 of these isolates belongs to *Pseudomonas*, and 4 *Pseudomonas* have ability to biodegrade phenanthrene. Morphological, physiological, biochemical, chemotaxonomic and molecular characteristics of the *Pseudomonas* isolates were determined. Two of phenanthrene decomposing *Pseudomonas* were found to contain plasmid. Relevance of these plasmids with phenanthrene decomposition and their molecular characterisation have been studied.

Key Words: Polycyclic Aromatic Hydrocarbon, *Pseudomonas*, Biodegradation

ŞEKİLER DİZİNİ

	Sayfa No
Şekil 1. <i>Pseudomonas</i> cinsine ait izolatların gram boyamaları.....	36
Şekil 2. İzolatların fenantren parçalama özellikleri.....	38
Şekil 3. İzolatların plazmid içeriklerinin %0.7'lik agaroz jeldeki görüntüleri.....	40
Şekil 4. İzolatların toplam protein profillerinin %12'lik SDS-poliakrilamid jel elektroforeziyle belirlenmesi...	41
Şekil 5. Çeşitli antibiyotiklerin izolatlar üzerindeki etkileri.....	43

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa No

Çizelge 1. <i>Pseudomonas</i> izolatlarının çeşitli morfolojik özellikleri.....	35
Çizelge 2. <i>Pseudomonas</i> izolatlarının çeşitli fizyolojik özellikleri.....	37
Çizelge 3. <i>Pseudomonas</i> izolatlarının bazı biyokimyasal özellikleri.....	39



SEMBOLLER ve KISALTMALAR DİZİNİ

BHI:	Brain heart infüzyon besiyeri
BSA:	Bovin serum albümin
DNA:	Deoksiribonükleik asit
EDTA:	Etilen diamintetraasetik asit
MHA:	Müller Hilton agar
MHB:	Müller Hilton broth
MIC:	Minimal inhibitöri konsantrasyon
MSM:	Minimal salt medium besiyeri
P.a.:	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PAGE:	Poliakrilamid jel elektroforezi
PAH:	Polisiklik aromatik hidrokarbon
PHB:	Poli- β -hidroksibutirat
PIA:	<i>Pseudomonas</i> izolasyon agar
SDS:	Sodyum dodesil sülfat
TSA:	Triptik soy agar
TSB:	Triptik soy broth

1. GENEL BİLGİLER

1.1. Giriş

Çevre sorunları dünyanın pek çok yerinde özellikle son 20 yılda güncel hayata girmiş, acilen çözüm bekleyen bir problemdir. Ormanların tahribi ve erozyon, düzensiz şehirleşme ve yeşil alan azalması, kıyıların bozulması, sanayide kullanılan kimyasal maddelerin canlılar üzerindeki olumsuz etkileri, nükleer enerjili termik santraller ve polisiklik aromatik hidrokarbon (PAH)'ların ekolojik dengede yapmış oldukları tahribat sadece Türkiye'de değil, dünyada da çözümleri aranan sorunlar haline gelmiştir.

Petrol ve petrol türevi olan PAH'lar, sucul ve karasal ekosistemlerde uzun süre kalabilen çevresel bileşikler sınıfındadırlar. Hidrofobik özelliklere sahip olan çoğu PAH'lar suda çözünmez, sadece dağılır ve süspansiyon olmuş partikülleriyle suyu sararlar (1). Su ortamlarında çökmelerinin bir sonucu olarak göl, nehir, nehir ağzı ve okyanuslarda büyük PAH sedimentlerini oluştururlar. Deniz sedimentlerindeki PAH konsantrasyonları 100 ng/g'dan 100.000 ng/g sediment'e kadar değişebilir (2, 3, 4). Sahil ekosistemlerinde yağların varlığının anlaşılması oldukça önemlidir. Bu ekosistemlerdeki yüksek PAH seviyeleri insan sağlığını bozar ve deniz ortamındaki kurulu dengeyi de tahrip eder. PAH'ların toksik, mutajen ve kanserojen özelliklerinin de olduğu bilinmektedir (5, 6).

PAH'lar fotooksidasyon ve kimyasal oksidasyon yollarıyla parçalanırlar. Ancak, biyolojik transformasyon PAH'ların doğadan temizlenmesinde hakim duruma gelmiştir. PAH'ların doğal mikroorganizma popülasyonları tarafından biyolojik olarak parçalanmaları, çevrenin petrol ve diğer hidrokarbon kirliliklerinden eliminasyonunda primer mekanizmadır (7). Hem prokaryotik hem de ökaryotik biyolojik parçalama mekanizmaları, PAH halkalarına enzimatik tutunmanın başlaması için bimoleküler oksijenin varlığına ihtiyaç duyar (8). Bununla beraber, birçok bakteri, düşük moleküler ağırlığa sahip PAH'ları karbon ve enerji kaynağı olarak kullanabilirler (9, 10).

PAH'ların bakteriyal parçalanmaları biyokimyasal ve genetik olarak gerçekleşmektedir (11-15). Bu yollar için ekstrakromozomal gen lokasyonları mevcuttur. Deniz, tatlısu ve toprak ekosistemlerindeki petrol ve hidrokarbonların biyolojik olarak parçalanma yollarını aydınlatmaya yönelik çeşitli çalışmalar vardır. Şu ana kadar naftalen (16, 17), fenantren (17-19) ve antrasen (10) gibi çeşitli PAH'ların bakteriler tarafından parçalanmaları çalışılmıştır. Naftalenin bir plazmidde mevcut olan genlerin kodladığı enzimler tarafından parçalandığı bulunmuştur. Bu çalışmaların çoğu zaman, denizlerdeki yağların degradasyonu üzerine yoğunlaştığı dikkat çekmektedir (20, 21). Çevredeki hidrokarbon kirliliklerinin biyolojik olarak parçalanma oranlarının arttırılması için son zamanlarda doğal veya biyolojik esaslı temeller kullanılarak oluşturulmuş mikroorganizmaların kullanılmaları düşünülmektedir.

PAH'ları parçalayan bakterilerin belirlenmesi, izolasyonu ve karakterizasyonu çevrenin bunlardan daha kısa bir sürede temizlenmesi açısından büyük öneme sahiptir. Bu nedenle, bu çalışmada, fuel oil ile kirlenmiş bir sahadan alınan örneklerde PAH'ları parçalayan bakterilerin tespit edilmesi, bunlar arasından *Pseudomonas* cinsine ait olanların belirlenmesi, bunlardan plazmid içerenlerin ayırt edilmesi ve bu plazmidlerin biyolojik özelliklerinin belirlenmesi amaçlanmaktadır.

1.2. Polisiklik Aromatik Hidrokarbonların Çevreye Bulaşmaları

Son yıllarda Alaska'daki, yağ tankeri Exxon Valdez'den (22), Texas'tan, Rhadoe Adası ve Delaware (23)'den toplam 200.000 barrel'den fazla ham petrolün doğaya dökülmesi, dikkatleri çevrenin hidrokarbon kontaminasyonu problemi üzerinde yoğunlaştırmıştır (21). Dünyada, çoğu antropojenik kaynaklardan olmak üzere yılda, 1.7 - 8.8 milyon metre ton petrol üretildiği ve bunun önemli bir miktarının da zararlı olarak ya kullanım sonucu ya da kullanılmadan çevreye döndüğü bilinmektedir (7).

Petrol ve petrol türevi olan PAH'lar, kullanım esnasındaki hatalar ve ihmaller sonucunda, petrol dökülmesi ve fosil yakıtların tamamen yanmadan atılmalarıyla çevreye bulaşmaktadırlar. Dünyada petrol

taşımacılığı daha çok tankerler ile deniz yolları kullanılarak yapıldığı için okyanus ve denizlerin kirlenme riski karalara göre daha yüksektir.

Kirlenmenin büyük bir kısmı tanker ve gemi seferlerinden kaynaklanır. Tankerler yüklerini boşalttıktan sonra dengelerini sağlamak için depolarına su alırlar ve bunu boşalttıkları zaman su ile birlikte PAH'ları da denizlere verirler. Tankerlerin dışındaki gemiler de gerek yağlama ve gerekse pis suların dışarı atılmasıyla çevre kirliliğine katkıda bulunurlar. Ayrıca, petrol arama çalışmaları esnasında da çevreye bulaşma olmaktadır. Otomobil ve öteki sanayi dallarından her yıl doğaya karışan petrol atıklarının miktarları da az değildir. Bunlardan kullanılmış endüstriyel yağ, hidrolik sıvılar, çözücüler ve soğutucular çevreye bulaşır ve çeşitli su yollarıyla denizlere ulaşırlar. Karalarda petrolün taşındığı borularda meydana gelen sızmalardan ve depoların temizlenmesiyle oluşan pis sulardan da fazla miktarda PAH çevreye bulaşmaktadır. Bunların yanısıra petrokimya tesislerinin atık ürünleri olan pek çok zararlı madde ve PAH'lar da çevreye (bir göl veya nehre) verilmektedir. Bu atıkların bir kısmı toprakta tutulmakta, bir kısmı da yağmur, kar ve şehir sularıyla okyanus ve denizlere ulaşmaktadır.

Çeşitli kaynaklardan doğaya verilen ve sonunda okyanus ve denizlere ulaşan PAH'ların bir kısmı, çeşitli olaylar sonucu zamanla gözden kaybolur. Bu, kirlenmenin sona erdiğini göstermez. Sadece buharlaşma, su yüzeyine yayılma ve kısmen çözünme, emülsiyon haline gelme, dip sedimentlerinde birikme, canlı organizmalarda oksitlenme ve parçalanma, fotolitik olarak oksidasyona uğrama ve canlı organizmalar tarafından alınma ve depolanma gibi olaylar neticesinde kirlenme başka bir kirliliğe dönüşür.

Deniz yüzeyine düşen PAH'ların yaklaşık %25'i bir gün içinde buharlaşır. Kalanın büyük bir kısmı emülsiyon haline dönüşür ve küçük tanecikler halinde suya karışır. Taneciklerin ağır metal ihtiva edenleri de dibe çökerek sedimentleri oluştururlar ve böylece, yeni bir problemin doğmasına sebep olurlar. Petrolün bir kısmı emülsiyon haline gelmeden fotolitik olarak, bir kısmı da mikroorganizmalar tarafından parçalanır. Denizlerdeki mikroorganizmalar kuvvetli PAH parçalayıcılardır.

1.3. Polisiklik Aromatik Hidrokarbonların Biyolojik ve Fiziksel Etkileri

PAH kirliliğinin etkisi uzun ve kısa süreli olmak üzere iki türdür. Uzun süreli etki henüz iyi bilinmezken, kısa süreli etki oldukça iyi aydınlatılmıştır ve bu da kaplama veya havasız bırakma ve zehirlenme olmak üzere ikiye ayrılır.

Bunlardan kaplama veya havasız bırakma da ışığın geçişini azaltma, çözünmüş oksijeni azaltma, deniz kuşlarına zarar verme ve havasız bırakma şeklinde dörde ayrılır.

Üzerinde petrol tabakası bulunan suyun 2 m derindeki ışık konsantrasyonu, petrol tabakası bulunmayan suyun aynı derinliğindekinden yaklaşık %90 daha azdır (24). Bu, fotosentezi dolayısıyla, bitkilerin büyümelerini olumsuz yönde etkiler. Petrol tabakası ayrıca, suyun oksijen almasını da sınırlar ve böylece, mikroorganizmalar başta olmak üzere su içerisinde yaşayan tüm canlılar oksijensiz kalırlar. Deniz suyunun petrolle kirlenmesi özellikle deniz kuşlarını da olumsuz yönde etkiler. Kuşların tüyleri birbirlerine yapışır ve kuşlar artık uçamaz hale gelirler. Ayrıca, tüyler izolasyon özelliklerini de kaybederler. Yine petrol tabakası suyun havalanmasını da engellediği için alg ve liken gibi çeşitli bitkilerin ölümüne sebep olurlar.

Yakın zamana kadar uçucu hidrokarbonların canlılar üzerinde zararlı bir etkiye sahip oldukları bilinmiyordu. Ancak, son zamanlarda çok düşük konsantrasyonlarının dahi canlılar üzerinde etkili oldukları tespit edilmiştir. Yüksek hidrokarbon konsantrasyonlu ortamlarda kalan hayvanlarda ölümle sonuçlanan hücre tahribatları meydana gelir. Özellikle larval ve genç devrelerdeki deniz canlıları hidrokarbonlardan büyük ölçüde etkilenirler.

Benzen, toluen ve ksilen gibi aromatik hidrokarbonlar alifatik hidrokarbonlardan çok daha zehirlidirler. Bunlar, özellikle insanlar için çok toksiktir. Naftalen ve fenantren de balıklar için oldukça zehirlidir.

Sahile yakın yerlerde meydana gelen kirlenme çok daha etkilidir. Bu, özellikle balıklar, yengeç gibi kabuklular ve omurgasızların ölümüne sebep olmaktadır. Ayrıca, tabana çökerek sediment oluşturan kirlenme de oldukça önemlidir. Bu, tabanda yaşayan tüm canlıların ölümüne sebep olur. Vücuda giren hidrokarbonlar ağır metaller gibi uzun süre değişmeden vücutta kalabilmekte ve bir canlıdan diğerine yine

bozulmadan geçebilmektedirler. Bu sayede, başlangıçta çok düşük olan hidrokarbon konsantrasyonu giderek artar ve besin zinciri yoluyla insana kadar ulaşabilen küçümsenemeyecek bir miktar haline gelir. Bu şekilde kirlenen besinler hem tat hem de koku yönünden çok farklı özellikler kazanırlar. Bu maddeler ayrıca, yağ dokuda çözünerek pestisidlerin birikmeleri için uygun ortamlar oluştururlar (24).

1.4. Denize Dökülen Polisiklik Aromatik Hidrokarbonların Temizlenmesi

Denize dökülen petrolün temizlenmesinde çeşitli metotlar geliştirilmesine rağmen, günümüzde her kazada uygulanabilen iyi bir yöntem bulunamamıştır. Uygulanmakta olan metotlar, yayma, bariyerle çevirme, su köpüğü kullanma, kimyasal madde kullanma, mekanik temizleme, sorbant kullanma, çöktürme, emülsiyon haline getirme ve mikroorganizma ekimi yöntemleridir (24).

1.4.1. Polisiklik Aromatik Hidrokarbonların Mikrobiyal Parçalanması

Çevreye bulaşan hidrokarbonların doğal mikroorganizma popülasyonları tarafından biyolojik olarak parçalanmaları, PAH kirliliklerinin yok edilmesinde primer mekanizmadır (7). Biyolojik olarak parçalanma, PAH bulaşmış ortamlara aynı doğal mikroorganizmalar ekilerek hızlandırılır. Ancak, bu işi farklı mikroorganizmalar yaptığından, ekilecek mikroorganizmalar çeşitli olmalıdır. Ayrıca, dökülen PAH'ların ekilen mikroorganizmalarla birkaç gün temasta kalmaları sağlanmalıdır.

PAH'ların parçalanması gibi bazı metabolik fonksiyonlar plazmidlerde kodlanan genler tarafından gerçekleştirilir (11, 12). Katabolik plazmidler, bir organizmanın büyümesi ve hayatını devam ettirmesi gibi görevler üstlenen zorunlu genetik elementler değildirler. Fakat, plazmidler hücrelere, kendilerinde mevcut olmayan metabolik çok yönlülük katarlar. PAH'ların mikrobiyal parçalanmaları çeşitli çevresel parametrelerin yanısıra, değişik biyolojik faktörlerden de etkilenir (21).

1.4.2. Polisiklik Aromatik Hidrokarbonların Yıkımlarını Etkileyen Biyolojik Faktörler

Çevreye bulaşmış PAH'lar ilk olarak bakteri ve funguslar tarafından parçalanırlar. Mikroorganizmalar, hidrokarbonları yalnız başlarına, sadece sınırlı oranlarda metabolize ederler. Ancak, toprak, su ve deniz ortamlarında kompleks hidrokarbonları parçalayabilmek için geniş enzimatik kapasitelerinden dolayı karışık kültürlerle ihtiyaç duyulur.

PAH'ların parçalanma ve kullanılmaları bakteriyal ve fungal cinsler tarafından gerçekleştirilmektedir (9, 10). Floodgate (25), denizde 25 hidrokarbon-parçalayan bakteri ve 27 fungus cinsini listelemiştir. Yapılan benzer bir derlemede de toprak izolatlarının 22'sinin bakteriyal, 31'inin fungal cinslere dahil olduğu belirlenmiştir (26).

Yayınlanmış çalışmalardan (21) hareketle, hem toprak hem de deniz ortamlarında en önemli hidrokarbon-parçalayan bakterilerin *Achromobacter*, *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Flavobacterium*, *Nocardia* ve *Pseudomonas* ve korineformlar oldukları tespit edilmiştir. Chesapeake Körfezi suyu ve sedimentinden alınan örneklerdeki petrol-parçalayan bakterilerin nümerik sınıflandırılmasında, *Pseudomonas*, *Micrococcus* ve *Nocardia*, *Enterobacteriaceae* familyası üyeleri, aktinomisetler ve korineformların fazla miktarda oldukları bulunmuştur (27). Funguslar arasında *Aureobasidium*, *Candida*, *Rhodotorula* ve *Sporobolomyces* spp. genel deniz izolatları ve *Trichoderma* ve *Mortierella* spp. de genel toprak izolatlarıdır. Hidrokarbon-parçalayan *Aspergillus* ve *Penicillium* spp. her iki ortamdan da sıkça izole edilmiştir. Kirk ve Gordon (28)'un çalışmalarına dayanarak, kumsal-adapte cinsler olarak *Corollospora*, *Dentryphiella*, *Lulworthia* ve *Varicosporina* da listeye ilave edilmiştir.

Bakterilerin, deniz ortamında mikrobiyal komünitenin predominant hidrokarbon-parçalama özelliği gösteren elementleri oldukları düşünülmektedir. Sahile yakın bölgelerde (29, 30), gel-git olayı sahalarında (28, 31), tuz bataklıkları ve tropik kıyılarda fungusların sayılarında artış olduğu belirlenmiş ve bunların mikrofloranın bir bileşeni olduğu gösterilmiştir (25). Fungusların suya batmış tahta (28), su yüzey filmi, ayrıştırma algleri ve katran yüzeyi (32) gibi özelleşmiş nişlere sahip oldukları belirlenmiştir.

Bazı çalışmalarda, deniz ortamındaki hidrokarbonların bakteri ve funguslar tarafından parçalama dereceleri karşılaştırılmıştır. Valker ve Colwell (33), Chesapeake Körfezi'nde 0 ve 5°C'de model bir petrolü parçalayan bakterileri belirlediklerini, 10°C'de ise flamentsiz fungusların petrol parçalanmasına yardım ettiklerini bildirmişlerdir. Hidrokarbon-parçalayan bir fungus olan *Cladosporium resinae* inokülüne ilave edildiği zaman, petrol parçalanmasının %20-40'nı meydana getirdiği gözlenmiştir. Dört ay boyunca petrol-bulaşmış sedimentlerdeki maya populasyonunun arttığı fakat, petrol olmasına rağmen, açık-okyanus sularında azaldığı da belirlenmiştir (29). Ayrıca, Amoco Cadiz Kuzey Denizi'ne dökülen ham petrol ile birlikte yaşamaya alışmış az sayıda maya da tespit edilmiştir (32).

Su ekosistemlerindeki PAH'ların parçalanmasında fungus ve bakterilerin etkinliklerinin karşılaştırıldığı çalışmaların az olduğu bilinmektedir. Mayalar, göl ve nehirlerde açık okyanuslardan daha fazla bulunur. Küflerin sayısı ise genelde tatlı sularda, deniz suyu örneklerinden daha yüksektir. Bir çalışmada, tatlı su sedimentlerindeki hidrokarbon-kullanan bakterilerin, maya ve filamentli fungusların 100-katı fazla sayıda olmalarına rağmen, iki grubun biyomasları arasındaki ilişkilerin hemen hemen eşit olduğu rapor edilmiştir (34).

Bakteri ve funguslar, toprakta da fazla miktarda bulunurlar ve her iki grubun yoğunlukları PAH'ların biyolojik olarak parçalanmalarını ayarlar. Hidrokarbon-kullanan bakteri ve funguslar PAH bulaşmış topraklardan kolayca izole edilebilirler. Petrol ve petrollü maddelerin toprağa inokülasyonları, ortamdaki bakteri ve mantarların sayılarının artmasına sebep olur. Topraktaki hidrokarbonların bakteri ve funguslar tarafından parçalanma oranlarının karşılaştırıldığı bir çalışmada, kum dolu bir yerde *n*-heksadekanin kullanımının %82'sinin bakteriler ve sadece, %13'ünün funguslar tarafından yapıldığı gözlemiştir (35).

Alg ve protozoalar da sucul ve karasal ekosistemlerin her ikisinde de bulunabilen mikrobiyal komünitenin önemli üyelerindedirler. Ancak, hidrokarbon parçalamadaki gereklilikleri kesin olarak bilinmemektedir ancak, ham petrol karışmış bir hidrokarbon substratını kullanabilen bir alg olan *Prototheca zopfii*'yi izole etmişlerdir (36). Yine benzer bir çalışmada, naftaleni okside eden 9 siyanobakter, 5 yeşil alg, 1 kırmızı alg, 1 kahverengi alg ve 2 diatome tespit edilmiştir (37). Protozoaların hidrokarbon kullandığı bilinmemektedir. Hidrokarbon-kullanan maya ve

bakterilerin bulunduğu bir ortama protozoa kültürü ekildiğinde, bunun ham petrolü direkt olarak kullanamadığı belirlenmiştir (38).

1.5. Mikroorganizmaların Polisiklik Aromatik Hidrokarbonlara Adaptasyonu

1.5.1. Mikroorganizmaların Önceden Polisiklik Aromatik Hidrokarbonlara Maruz Kalmalarının Adaptasyondaki Rolü

Bir mikrobiyal komünitenin, hidrokarbonlara önceden maruz kalması, hidrokarbonların hızlı bir şekilde nasıl parçalanabildiğinin aydınlatılmasında önemlidir. Komünitenin, hidrokarbon-okside etme potansiyelinde artış meydana getiren bu hadise adaptasyon olarak bilinir. Adaptasyon ile ilgili üç mekanizma bilinmektedir. Bunlar; (i) spesifik enzimlerin indüksiyonu ve/veya depresyonu, (ii) yeni metabolik kabiliyetler ile sonuçlanan genetik değişiklikler ve (iii) ilgili bileşiklerin transform olabildiği organizmaların seçici olarak zenginleştirilmesidir. Seçici zenginleştirme, çevrede hidrokarbon ve petrol parçalanması çalışmalarında geniş bir şekilde gözlenir. Floodgate (25), Bosset ve Barth (26), Walker ve Colwell (33), Atlas (39) ve Cooney (40) tarafından derlenen fazla sayıdaki raporlar, genel olarak ekosistemin kontaminasyon derecesini yansıtan hidrokarbon-kullanan mikroorganizmaların seviyelerini göstermiştir. Bazı çalışmalar, çeşitli heterotrofik populasyonların değişmediğini ancak, bazı durumlarda ortamlarda hidrokarbon-parçalayan yeni birkaç cins varlığını göstermiştir. Hidrokarbon bulaşmasının mikrobiyal komünitenin genetik kompozisyonu üzerine olan özel etkisi çevresel veya lokal şartlara büyük ölçüde bağımlılık gösterdiği sanılmaktadır.

1.5.2. Mikrobiyal Komünitenin Genetik Kompozisyonunun Değişmesiyle Adaptasyon

Mikrobiyal komünitelerin kimyasal kontaminantlara adaptasyonu için enzim baskılanması veya indüksiyonu, genetik değişiklik ve seçici zenginleştirme mekanizmalarından sadece üçüncüsü ayrıntılı şekilde incelenmiştir.

Mikrobiyal komünitenin adaptasyonu için asıl genetik mekanizma, seçici zenginleştirme ve gen transferi ve mutasyon ile kimyasal kontaminant metabolizmasını kodlayan genlerin çoğaltılmasıdır. Hidrokarbonlara adaptasyon münasebetiyle bu işlemin direkt takip edilmesi son yıllarda, hidrokarbon-katalitik yolları kodlayan genler için spesifik DNA probu geliştirilmesiyle yapılabilmektedir. Sayler ve arkadaşları (41), koloni hibridizasyon tekniğini kullanarak, petrol-bulaşmış sedimentlerdeki PAH mineralizasyon oranlarının artırılması ve TOL (toluen oksidasyonu) ve NAF (naftalen oksidasyonu) plazmid problemlerine hibridize olan DNA sıralarını ihtiva etmekte olan kolonilerin sayısındaki artış arasında bir korelasyon olduğunu göstermişlerdir. Bununla beraber, koloni hibridizasyonu, kültür edilemeyen mikroorganizmalardaki DNA sıralarının tanınmasına imkan vermektedir (42). Çevresel örneklerden çıkarılan ve sonra prob haline getirilen DNA örneklerinde dot blot hibridizasyonu yöntemi, organizmanın kültürü ve izolasyonuna ihtiyaç duymaksızın özel DNA sıralarının tanınmasında kullanılmıştır (43, 44). Yeni tanımlanmakta olan polimeraz zincir reaksiyon (PCR) tekniği dot blot hibridizasyon metodunun hassasiyetini arttırmayı başarmıştır (45).

Hidrokarbon metabolizmasıyla ilişkili genler için nükleik asit problemleri ile bu metodların kullanılması, bu genlerin mikrobiyal komünitedeki sıklığının ölçülmesine imkan verecektir.

1.5.3. Adaptasyonda Plazmidlerin Rolü

DNA'nın, transformasyon veya konjugasyon yoluyla transfer edilebilen ve alıcı organizmaya, hidrokarbon-okside etme özelliği (yeni bir fenotip) kazandırabilen yüksek düzeyde hareketli bir DNA formu olan plazmid DNA'sı, genetik adaptasyonda özel bir öneme sahiptir. *Pseudomonas spp*'de naftalen, salisilat, kamfor, oktan, ksilen ve toluen'i parçalama özelliklerinin plazmidler üzerinde kodlandığı gösterilmiştir (11, 37). Petrol ve diğer hidrokarbonlar için doğal mikrobiyal popülasyonların ortaya çıkması, hidrokarbon metabolizması için gerekli enzimleri kodlamakta olan plazmidlere sahip suşlara seçici bir avantaj kazandırır.

Hidrokarbonlara adaptasyonda plazmidlerin rolleri için dolaylı delil, hidrokarbon ile bulaşmış ortamdan izole edilen bakteriler arasında

plazmid ihtiva edenlerin sıklığının belirlendiği bazı çalışmalar sayesinde ortaya çıkarılmıştır. Hada ve Sizemore (46), plazmid DNA varlığı için aktif petrol bölgeleri (Meksika Körfezi)'nden alınan örneklerde 440 *Vibrio* izolatını taradı ve bunların yüksek oranda plazmid (35'e karşı %23) ve çok yönlü plazmid (58'e karşı %29) taşıdıklarını buldular. Aynı körfezin Campeche Bank bölgesindeki sedimentlerden izole edilen bakteriler üzerinde yapılan bir çalışmada ise plazmid sıklığı ve petrol alanına yakınlık arasında açık bir ilişkinin olmadığı fakat, sediment örneklerinin alındığı derinlik ile pozitif bir korelasyon olduğu sonucuna varılmıştır (47). Petrol alanında plazmid-taşıyan bakterilere yüksek derecede rastlamama, çalışma zamanında bölgedeki petrol bulaşmasının düşük seviyede olmasına bağlanmıştır. Evsel ve endüstriyel atıkların bırakıldığı bir nehir sedimentinden izole edilen bakterilerin %15'inin, kirlenmemiş bir bölgeden alınan bakterilerin de %10'unun plazmid taşıdıkları rapor edilmiştir (48). Diğer bir çalışmada ise uzun zaman önce hidrokarbon ile kontamine olmuş bir yerde, bozulmamış bir yere göre daha yüksek bir sıklıkla plazmid ihtiva eden bakterilerin izole edildiği gözlenmiştir (49). Fredrickson ve arkadaşları (50), karasal sedimentlerin derin tabakalarından (29-260 m) elde edilen bakteriyal izolatlarda, yüzey veya sığ yerlerdekilere daha yüksek bir plazmid sıklığına rastlandığını belirtmişlerdir. Bu bilim adamları, plazmidlerin bazılarının aromatik bileşikler katabolize eden genleri taşıdığını ve bunların TOL plazmid probuna hibridize olduğu hipotezini ileri sürmüşlerdir. Schutt (51), yüksek konsantrasyonda humuslu bileşikler içeren bir distrofik gölden alınan bakteriyal izolatlar arasından plazmid taşıyanların benzer özellikler gösterdiklerini tespit etmiştir. Adaptasyon esnasında mikrobiyal komünitenin genetik değişikliğine plazmid DNA'sının iştirakini ispatlamak için, hidrokarbon ihtiva eden çevrelerdeki doğal bakterilerin ihtiva ettiği plazmidlerin fonksiyonlarının tanımlanmalarıyla ilgili daha ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

1.6. Bakteri Hücre Yapısı Hakkında Genel Bilgiler

Prokaryotik canlı hücrelerinin ince yapıları, elektron ve ışık mikroskobu çalışmalarıyla tamamen aydınlatılmıştır. Tipik bir prokaryot hücre, hücre duvarı, hücre membranı, ribozom ve nüklear bölgeden ibarettir (52).

Hücre membranı saran hücre duvarı, hücreye desteklik sağlayan ve onu koruyan, hücrenin dışındaki yapıdır. Prokaryotik canlılar hücre duvarlarının durumuna ve diğer bazı özelliklerine göre dört büyük gruba ayrılarak incelenirler (53). Bunlar; gram-negatif eubakteriler, hücre duvarına sahip olan gram-pozitif eubakteriler, hücre duvarına sahip olmayan eubakteriler, arkheabakterlerdir.

Hücre membranı, hücreyi dışarıdan gelebilecek olan herhangi bir etkiye karşı koruyucu vazife gören bir yapıdır. Ribozomlar, protein ve ribonükleik asit molekülünden oluşan küçük partiküllerdir. Hücredeki ribozomlar, sadece elektron mikroskobu ile görülebilirler. Bir prokaryotik hücrenin ihtiva ettiği ribozom sayısı 10.000 civarındadır. Prokaryotik ribozomlar 30S ve 50S büyüklüğünde iki alt birimden oluşan nükleoprotein partikülleridir. Sağlam bir prokaryot ribozomu da 70S büyüklüğündedir.

Prokaryotik hücreler gerçek bir nükleusa sahip değildirler. Prokaryotik hücrelerde nükleusun fonksiyonlarını sadece tek ve uzun bir deoksiribonükleik asit (DNA) zinciri yerine getirmektedir. Nükleik asit molekülü, bu hücrelerde az veya çok serbest olarak bulunmaktadır. Bu nedenle, bu hücrelerde bir nükleustan ziyade nüklear bölgeden bahsedilmektedir. Ancak, bu hücrelerdeki nükleik asit molekülüne de ökaryotik hücrelerdekine benzer olarak kromozom adı verilmektedir. Ayrıca, prokaryotik hücreler bu kromozom DNA'sına ilave olarak plazmid olarak adlandırılan küçük, halka şeklinde DNA'lara da sahiptirler.

Hepsi olmamakla birlikte, pek çok prokaryotik mikroorganizma hareket edebilme özelliğine sahiptir. Prokaryotik hücrelerin hareketleri, genellikle flagella adı verilen organeller yardımıyla olmaktadır. Bakteri flagellaları gerek sayı ve gerekse bakteri üzerindeki yerleşim yeri bakımından farklılıklar gösterir. Bazı bakterilerde hareketi sağlayan bir adet flagella bulunmaktadır ve bu, bakterinin kutuplarından birine tutunmuştur. Böyle bakterilere tek flagellalı (monotrichia) bakteriler adı verilir. İki kutupta birer tane olmak üzere iki flagella ihtiva eden bakteriler çift flagellalı (amphitrichia) ve bir veya iki kutbunda birden fazla flagelle ihtiva eden bakteriler de çok flagellalı (lophotrichia) bakteriler olarak adlandırılırlar. Kutupları dışındaki yerlerinde birden fazla flagella ihtiva eden bakterilere de "peritrichia" adı verilir. Her bir flagella saç şeklindeki tek bir protein (flagellin) tüpünden ibarettir.

Flagellaların rotasyonu su içerisinde burğu şeklindedir. Bunlar, ışık mikroskobu ile sadece özel boyamalar neticesinde görülebilen, çok küçük yapılardır. Ancak, flagellalar elektron mikroskobu ile kolaylıkla görülebilirler (52).

Bakterilerin çapları 0.1-5 µm arasında değişmektedir. Farklı tiplerde bakteri hücre şekilleri olduğu bilinmektedir. Küresel veya yumurta şeklinde olan bakteriler kok, silindirik şekilli olanlar basil, kıvrılan ve sık spiral şekilli yapılar oluşturan bakteriler ise spiral olarak adlandırılmaktadırlar (52).

Bir grup bakteri, karşılaştığı uygun olmayan şartlarda hayatını devam ettirebilmek için endospor olarak adlandırılan, dayanıklı, dinlenme formu olan yapılar oluşturmaktadır. Endosporlar, bakteri hücresi içerisinde meydana gelen, ısıya karşı oldukça dirençli ve kaynama ile dahi kolaylıkla ölmeyen dayanıklı yapılardır. Aktif olarak büyüyen bakteriler spor oluşturmazlar ancak, büyüme açlık veya diğer bazı nedenlerden dolayı spor oluşumu başlatılabilir. Bir bakterinin endospor oluşturup oluşturmadığının bilinmesi ve endosporun pozisyonu taksonomik olarak önemlidir. Endospor, hücrenin merkezinde ise merkezi endospor, ucunda kutba yakın ise terminal endospor ve uçlarla merkez arasında ise subterminal endospor olarak adlandırılır (52).

Çoğu prokaryotik hücreler yüzeylerinde sümüksü veya sakız gibi yapışkan maddeler meydana getirirler. Bu yapışkan maddeler, ekstrasellular polisakkaritten oluşmaktadır. Meydana gelen bu yapılara "kapsül" veya "yapışkan tabaka" denilmesine rağmen, daha genel bir terim olarak bunlara "glikokaliks" adı verilmektedir. Genel olarak glikokaliks, hücrenin dışında bulunan, polisakkarit ihtiva eden bir yapı olarak bilinmektedir. Glikokaliks, organizmanın türüne göre değişmesine rağmen, genellikle glikoproteinleri ve çok fazla sayıdaki farklı polisakkaritleri içermektedir. Glikokaliksin içerdiği polisakkaritler, polialkoller ve amino şekerlerden müteşekkildirler. Organizmanın kimyasal tabiatına göre glikokaliks tabakası kalın, ince, sert veya esnek olabilir (52).

Glikokaliks tabakası, bakterilerde birçok fonksiyonu yerine getirmektedir. Bakterinin dışındaki bu polisakkarit tabaka, patojenik mikroorganizmaların konaklarına tutunmasında önemli bir rol oynamaktadır. Bilindiği gibi kapsüle sahip olmayan mikroorganizmaların patojenite meydana getirmek için konak hücreye

grip, hastalık oluşturmaları zordur. Kapsüle sahip olmayan böyle bir organizma, hücredeki immün mekanizma tarafından kolayca tanınmakta ve ortadan kaldırılmaktadır. Ayrıca, polisakkarit tabakası bir miktar suyu da bağlayabildiğinden, glikokaliks tabakasının kurumaya karşı dirençlilik sağlanması yönünden önemli olduğu bilinmektedir (52).

1.7. *Pseudomonadaceae* Familyası

Düz veya eğri gram-negatif çomak şeklide olan bakteriler, polar flagella vasıtasıyla hareket ederler. Kemoorganotrof ve zorunlu aerobik bakterilerdir. Metabolizmaları solunumla olmaktadır ve hiçbir zaman fermentatif değildirler. Büyümeleri 4°C'den 43°C'ye kadar geniş ısı ortamlarında olmaktadır. Organotrafik olan *Pseudomonas*'lar karbon ve enerji kaynağı olarak bir-karbonlu organik bileşikleri kullanabilirler. Katalaz pozitif ve genellikle oksidaz pozitif bakterilerdir. DNA'nın G+C oranı %58-71'dir. *Pseudomonadaceae* familyası *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, *Frateuria* ve *Zoogloea* olmak üzere 4 cins ihtiva eder (54).

Geçmişte birçok bakteriyal cins *Pseudomonadaceae* familyasına yerleştirilmiştir. Kluyver ve van Niel (55), bu familyanın üç takım içinde 25'ten fazla cins ihtiva ettiğini ileri sürmüşlerdir. Bu fazla sayı, filogenetik kriterlerin incelenmesiyle zamanla azaltılmış ve "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology"nin sekizinci baskısında, olduğu gibi cins sayısı 4'e indirilmiştir (54).

Familyanın tip cinsi, çoğu gruplara fenotipik benzerlikleriyle gram-negatif bakterilerin en kompleks gruplarından biri olan *Pseudomonas*'tır. Bu cinsin üyeleri pek çok basit organik bileşiklerin kullanıldığı basit besiyerilerinde büyüyebilmeleriyle karakterize edilirler. Oksidaz reaksiyonu genellikle pozitif ve %G+C oranı ise 58-70 arasındadır. *Xanthomonas* suşları bitki patojenidirler. Bunlar, besinsel olarak *Pseudomonas*'lardan daha duyarlıdır ve karakteristik sarı hücrel pigment (ksanthomonadin) üretirler. Geç veya negatif oksidaz reaksiyonu verirler. Bunların G+C oranları %65-71 mol'dür. *Pseudomonas* ve *Xanthomonas* suşları asit tolerant değildirler ancak, *Frateuria* suşları pH 3.6'da büyüyebilirler. Bu cins için G+C oranı %62-64 mol'dür. *Zoogloea* cinsi doğal şartlar altında katı yüzeylere tutunmak için yapışkan bir kütle üretir ve belli laboratuvar şartları altında yapışkan

madde oluşumunu gerçekleştirebilirler. *Zoogloea*'nın DNA'sının %G+C oranı da 65 mol'dür.

Pseudomonadaceae familyası cinsleri arasındaki doğal ilişkiler *Xanthomonas* ve *Pseudomonas* için Palleronia ve arkadaşları (56) tarafından rRNA/DNA hibridizasyon verileriyle rapor edilmiştir. Son yıllarda, benzer teknikler kullanılarak *Frateuria* ve *Xanthomonas* arasındaki ilişkilerin *Frateuria* ve *Gluconobacter* ve *Acetobacter* arasındakinden daha sıkı olduğu gösterilmiştir (57). *Frateuria* cins, H₂S oluşumu, %30'luk glukoz ve D-mannozda büyüme, karbon kaynağı olarak L-arabinoz, D-liksoz ve L-liksoz kullanılmasıyla *Acetobacter* ve *Gluconobacter*'den ayrılabilir. *Frateuria*'nın diğer karakterleri genellikle, diğer iki cinsin sarı-kahverengi oluşumunu, glukoz-maya ekstrakt-CaCO₃ besiyerinde çözülebilir pigment oluşumu, glukozdan 2,5-diketoglukonat oluşumu ve Frateur's Hoyer mannitol besiyerinde büyüebilme özelliğine sahip olmamasıdır. *Gluconobacter* ve/veya *Acetobacter*'in suşlarının bazıları da bu özellikleri göstermektedir. *Zoogloea*'ya gelince, familyanın diğer cinsler ile olan filogenetik ilişkilerinin aydınlatılmasına yönelik çalışmalar yapılmış ancak, bu familyanın cinslerinin ihtiva ettikleri türler sadece denemeden ibarettir (58).

Özet olarak, *Pseudomonadaceae* familyası aerobik pseudomonadların temel özelliklerine sahip, üç cins (*Pseudomonas*, *Xanthomonas* ve *Frateuria*) ihtiva eder. Bu, filogenetik bir bakış açısından en tatmin edici düzenlemeyi göstermektedir. Bu cinslerdeki türlerin bazıları diğer familyaların üyelerine, *Pseudomonadaceae*'nin çoğu türlerinden daha sıkı bir yakınlık içinde olabilirler (59). Dördüncü cins olan *Zoogloea*, bir deneme üzerine familya içerisine yerleştirilmiştir. Pratik bir ayırım açısından, klasik fenotipik kriterlerle familyanın kesin sınırlarını belirlemek oldukça zordur ve cinsin farklarının aydınlatılması özel tekniklere ihtiyaç duymaktadır.

1.7.1. *Pseudomonas* Cinsi

Düz veya nispeten eğri ve çubuk şeklinde olan ve 0.5-1.0 x 1.5-5.0 µm boyutlarında bakterilerdir. Çoğu türler sudanofilik inklüzyonlar şeklinde görülen karbon rezerv materyali olarak poli-β-hidroksibutiratı biriktirirler. *Pseudomonas*'lar kapsül ile sarılı değildir. Dinlenme

safhalarına sahip olmadıkları bilinmektedir. Hücreler gram-negatif olarak boyanırlar. Hareket bir veya birkaç polar flagella ile olur ve nadiren de hareketsizdirler. Bazı türlerde kısa dalgalı lateral flagella da bulunabilir. Oksijen, terminal elektron akseptörü olarak fonksiyon görürken (aerobik), nitrat da bazı durumlarda, büyümenin anaerobik olarak oluşmasına müsaade etmek için alternatif elektron akseptörü işlevi görebilir. Ksanthomonadin üretilmez. Çoğu, asidik şartlar altında (pH 4.5) büyüme göstermez. Çoğu türler organik büyüme faktörlerine ihtiyaç göstermezler. Oksidaz pozitif veya negatif olabilirler. Katalaz pozitif ve kemoorganotroftirler. Bazı türler enerji kaynağı olarak H₂ veya CO₂ kullanabilen fakültatif kemolitotrofturlar. Doğada geniş bir şekilde yayılırlar. Bazı türler insan, hayvan ve bitkiler için patojendir. DNA'nın %G+C oranı 58-70 mol'dir. *Pseudomonas* cinsi tip türü, *Pseudomonas aeruginosa* (60)'dır.

1.7.2. Hücre Morfolojisi ve İnce Yapısı

Pseudomonas suşu hücreleri genellikle büyüklük ve şekilleri yönünden genel tanımlamadan farklıdır. Bazı türlerde (*P. putida*'nın bir sinonimi olan *P. ovalis*) hücreler ovaldir ve bazı bitki patojen türleri 4 µm boyunda olağan üstü hücrelere sahiptirler.

Hücreler sınırlı azot şartlarında büyüdüğü zaman çoğu türler fazla miktarda poli-β-hidroksibutirat (PHB) biriktirirler. PHB birikiminin çok düşük olduğu durumlarda (*P. pseudoalcaligenes* gibi), tanınmaları için spesifik enzimlerin meydana getirdikleri ekstraksiyon ve hidroliz (depolimerizasyon)'lere ihtiyaç duyulmaktadır.

Bazı türler (*P. vesicularis*, *P. pseudoflava*), glikojeni andıran bir glukoz polisakkariti biriktirirler (61). Glikojen, PHB'tan daha az göze çarptığından, tanınmaları için izolasyon ve kimyasal karakterizasyonlara ihtiyaç duyarlar.

Elektron mikroskopu çalışmaları, *Pseudomonas*'ların hücre membranına ve gram-negatif bakterilerin tipik hücre duvarına sahip olduklarını göstermektedir. Dondurma-kırma preparasyonunda, taşıma tabakaları tanımlanmıştır (62). *Pseudomonas aeruginosa* hücre membranının dört bileşeni, Hancock ve Nikoida (63) tarafından sukroz-gradient santrifigasyon preparasyonu ile izole edilip tanımlanmıştır.

P. aeruginosa ve *P. saccharophila* hücrelerinde mezozom-benzeri yapıların olduğu da belirlenmiştir (64).

Pseudomonas türlerinde rapidosom olarak bilinen mikrotübül özelliğindeki yapılar oluşurlar (65). *P. fluorescens*'deki bakteriyosinlerin polimerize olmuş kılıf ile rapidosomların aynı olduğu Amako ve arkadaşları (66) tarafından belirlenmiştir. *P. aeruginosa*'nın rapidosom durumunda daha önce aydınlatılmamış bazı özellikler, Baechler ve Berk (67)'in yaptığı çalışmalarla açıklanmıştır.

1.7.3. Pigmentasyon

Pigmentasyon, başlangıçta *Pseudomonas* cinsinin bir genetik karakteri olarak bilinirdi. Fakat, cinsin birkaç pigment oluşturmeyen tür ihtiva ettiği bilinmektedir. Koloniler ve diğer hücre kümeleri her zaman normal hücresel alt yapılardan dolayı bazı renkler gösterirler. *P. stutzeri* başka pigment oluşturmeyen cinsler ile gruplandırıldı fakat, bu türe ait birçok suşun kolonilerinin, hücrelerdeki sitokrom c'nin yüksek konsantrasyonundan dolayı yaşlandıkça kırmızımsı kahverengi bir renk oluşturdıkları tespit edilmiştir.

Pseudomonas'ın en iyi bilinen çözülebilir pigmentleri piyoverdin ve piyosiyanindir. Piyosiyaninin yapısı iyi bilinmesine rağmen, piyoverdinler sadece kısmi olarak karakterize edilmiştir. Floresant pigmentler, düşük demir içerikli besiyerlerde bolca üretilir ve fluoresansın ultraviyole radyasyonu ile uyarılmasıyla beyazdan mavi-yeşile kadar değişebilir. Maksimum uyarım için dalga uzunluğu 400 nm civarındadır. Ancak, pigmentler düşük dalga boyunda da iyi bir şekilde görülebilirler.

Piyoverdinler kararlı olmayan çeşitli bileşiklerdir. Son yıllarda, Meyer (68) ve diğer bilim adamları tarafından yapılan çalışmalar neticesinde (69), *P. fluorescens*'e ait piyoverdin pigmenti hakkında geniş bilgiler elde edilmiştir. Molekülün yapısının yakın bir gelecekte aydınlatılabileceği umud edilmektedir. Asıl bileşen, kompozisyonu türe göre değişen siklik peptide bağlı bir quinoline kromofordur. Meyer ve Hornsperger (70), piyoverdinin demir taşınmasında rol aldığını aydınlatmışlardır.

P. aeruginosa'ya ait piyosiyanin, çeşitli floresant ve floresant olmayan pseudomonadlar arasında bulunan en belirgin pigment

grubudur. Piyosiyenin mavi renge sahiptir ve fluoresent pigmentler gibi serbest olarak besiyeriye difüz ederler. Diğer fenazin pigmentleri daha az eriyebilir ve bazı örneklerde kolonilerin etrafında kristalize olurlar. *P. chlororaphis* türü tarafından üretilen yeşil bir pigment olan klororafin böyle bir pigmenttir. Fenazin pigmentleri fluoresent olmayan bazı türler tarafından da üretilirler (71).

P. indigofera'nın indigodin pigmenti ürettiği için "indigo bakteri"lerinden biri olduğuna karar verilmiştir (72). İndigoidin indol ihtiva eden bir besiyeride büyümekte olan "*P. indoloxidans*"ın etrafında toplanan, suda çözülebilen mavi bir bileşiktir (73).

Pigmentlerin, pseudomonadlar tarafından üretimleri diğer grup özellikleriyle ilişkili oldukları için genelde çok dikkat çeker ve çoğu örnekte taksonomik bir öneme sahiptir. Bununla beraber, pigmentlerin üretimleri durabilir veya özellikle laboratuvar şartlarında kültüvasyon süresi uzatıldığında düzensiz pigment oluşumları meydana gelebilir. Pigmentlerin taksonomik yönleri aynı cinsin farklı türlerinin veya ilişkisiz cins türlerinin benzer pigmentleri üretebilmeleri gibi özel durumlardan etkilenir.

1.7.4. Plazmidler

Plazmidler, *Pseudomonas*'ların genetik düzenlenmelerinin önemli bileşenleridirler. Plazmidlerin bazıları bakteriye üretkenlik faktörleri olarak imkan veren, bazıları çeşitli ajanlara karşı dirençlilik sağlayabilen (R plazmidi) veya bazıları cinsin çoğu üyelerinin besinsel değişimine yardım eden olağan dışı karbon kaynaklarını parçalama özelliği kazandırırılar. *Pseudomonas* plazmidlerinin çoğu son yıllarda tanımlanmıştır. Jacoby (74), plazmidlerde kodlanmış genlerin *Pseudomonas*'lara kazandırdığı özelliklerin bazılarını tekrar gözden geçirmiştir.

Pseudomonas'lara ait plazmidlerin sınıflandırılması yapılmış ve *Pseudomonas*'larda birbirine uymayan en az 10 grup belirlenmiştir (75, 76). *Pseudomonas* plazmid araştırmalarının çeşitli safhaları Jacoby (74) tarafından belirlenmiştir. Çeşitli plazmidler farklı konaklara sahiptirler. En geniş konak, IncP-1 plazmidlerinin sahip oldukları konaklardır. IncP-2'nin plazmidleri R plazmidlerini ve yaygın olmayan karbon bileşiklerinin parçalanması için gerekli genleri taşıyan plazmidleri ihtiva

eder. Genel olarak plazmidlerin büyüklükleri 19-60 megadalton arasındadır. Ancak, 300 megadaltonu geçen bazı plazmidler de vardır ve bunlar da büyük *Pseudomonas* plazmidleri olarak adlandırılırlar. IncP-2'nin dışında IncP-9'da da parçalama plazmidleri bulunmuş fakat, bunların bazıları sınıflandırılmamıştır. CAM, OCT, SAL, NAH, TOL ve XYL olarak adlandırılan parçalama plazmidleri sırayla kafur, *n*-oktanol, salisilat, naftalen, toluen ve ksilenin parçalanmalarını sağlarlar.

Plazmidlerde kodlanmış enzimatik sistemlere sahip birçok nadir bileşiği parçalama kapasitesinde olan bazı *Pseudomonas* suşları laboratuarda geliştirilebilmiştir. Bir çalışmada ham petrolde mevcut olan kompleks PAH'ların ve diğer bileşiklerin parçalanması için gerekli genleri taşıyan çeşitli plazmidler *P. aeruginosa* ve *P. putida* suşlarına transfer edilebilmiştir (77).

1.7.5. Antibiyotik Duyarlılığı

Çoğu *Pseudomonas*'lar birçok antimikrobiyal ajana karşı dirençlidir. Antibiyotik ve ilaçlar, pratik öneme sahiptir ve genellikle yeni türlerin tanınmasına yardımcı olurlar. Bununla beraber, *P. aeruginosa* üzerindeki araştırmalar, cinsin diğer türleri üzerindikilerden çok daha detaylıdır (78).

Beş farklı penisilinin *Pseudomonas*'lara karşı aktif olduğu tespit edilmiştir ve *P. saccharophila* için penisilin G'nin 5 mg/ml minimal inhibitörü konsantrasyon (MIC) olduğu rapor edilmesine rağmen (79), diğer çoğu türlerin dirençliliği için bu değer çok yüksektir. *P. aeruginosa* enfeksiyonuna karşı genel olarak kullanılan β -laktam bir karbenisillin'dir. Karbenisillin hücre büyümesi ve filament oluşumunu engeller fakat, duyarlılığı genelde çok yüksek değildir ve MIC değeri 25-200 mg/ml arasında değişir. Karbenisillin uygulanmasına cevapta bu antibiyotiğe dirençli mutantların ortaya çıktığı rapor edilmiştir (80, 81).

Karbenisilline dirençlilik, genleri plazmid tarafından taşınan β -laktamazdan dolayı olabilir. Plazmidler, IncP-1'e ait olabilir ve dirençlilik, enterik bakterilere transfer edilebilir (82). β -laktamazın 7 farklı çeşidi en az 8 farklı gruba ait 24 *Pseudomonas* plazmidinde bulunmuştur (83). β -laktamaza ilave olarak, dirençlilik, antibiyotiğin hedef yere bağlanma güçlüğünden dolayı da olabilir (84).

Pseudomonas'ların β -laktama cevabı, bu maddeleri, büyüme için kullanılan maddeler gibi kullanılmalarıyla da sonuçlanabilir. Johnson (85), *P. fleurescens*'in benzilpenisilini karbon, azot ve enerji kaynağı olarak kullanılabilen bir suşunu izole etmeyi başarmıştır. *P. cepacia*'nın 16 suşu ve "*P. marginata*" (*P. gladioli*) ve *P. caryophylli*'nin bazı suşlarının penisilin G'yi kullandığı gösterilmiştir (86). Suşların bu antibiyotiklere karşı dirençli olmalarına rağmen, benzilpenisilin türevleri olan ampisillin ve karbenisillinin bu suşlar tarafından kullanıldığı belirlenmiştir. Penisilin-kullanan suşlar yüksek seviyede β -laktamaz aktivitesine sahiptir fakat, enzimin, penisillinde büyüme için gerekli olmadığı görülmüştür.

Gentamisin, tobramisin ve amikosin *P. aeruginosa*'ya karşı çok etkili olan aminoglikozidler arasındadırlar. Predominant etkisi protein sentezinin inhibisyonu olmasına rağmen, bu antibiyotiklere duyarlılık basit kelimelerle açıklanamaz ve *in vitro* antibiyotik aktivitesinin tahmini, *in vivo* durumu açıklamak için yeterli değildir. Test besiyerinin (özellikle divalent katyon konsantrasyonu) pH ve iyon konsantrasyonunun etkisi çok sıkı kontrol edilen faktörlerdir (87).

P. aeruginosa plazmidlerinin yaklaşık yarısı civa iyonlarına dirençlidir (75). Bazı *Pseudomonas* plazmidleri tarafından krom, bor ve tellur'a dirençlilik oluşturdıkları belirlenmiştir (88).

1.8. *Pseudomonas*'ların Özel Karakterlerinin Test Edilmesi

1.8.1. Besinsel ve Diğer Fiziksel Özelliklerin Taranması

Stanier ve arkadaşları (89) tarafından tanımlanan besiyeri (Stanier's besiyeri), *Pseudomonas* suşlarının besinsel taranması ve çeşitli fiziksel özelliklerinin test edilmesinde geniş bir şekilde kullanılmaktadır. Çok tatmin edici sonuçlar, tüm *Pseudomonas* türlerinin ototrofik ve heterotrofik zenginleştirme ve kültüvasyonu için gerekli olan ve Palleroni ve Doudoroff (90) tarafından tavsiye edilen benzer bir besiyeri (Palleroni ve Doudoroff besiyeri) kullanılarak sağlanmıştır.

1.8.2. Pigment Oluşumu

Pseudomonas'ların piyoverdin pigmenti üretimlerinin belirlenmesi için King ve arkadaşlarının (91) besiyeri (King ve arkadaşlarının B besiyeri) tarafından önerilen besiyeri çok yaygın olarak kullanılır .

Fluoresant pseudomonadlar tarafından piyoverdinlerin üretim yöntemlerinin incelenmesinde yanlış ifade edilen veya önemsenmeyen bir nokta, fluoresansın gözlenmesi için kullanılan ultraviyole lambasının tipidir. Bazı *Pseudomonas* türleri (*P. cepacia*, *P. gladioli*, *P. coryophylli*) bazan fluoresans pigment üretimi için yanılmaya sebep olan, difüz olabilen yeşil-sarı pigment üretir; bunlar, sadece piyoverdinlerin fluoresans olacağı kısa dalga boylu (yaklaşık 254 nm) ultraviyole ışık lambası altında, katı besiyeri üzerindeki kültürlerin incelenmesiyle piyoverdinlerden ayırt edilebilirler.

King ve arkadaşlarının (91) besiyeri A'sı, genellikle fenazin pigmentleri üretimleri için tavsiye edilmiştir. Bu besiyeri her zaman deneylerde etkili olmadığından, başka besiyeriler de alternatif olarak tavsiye edilmektedirler. Özellikle laboratuvar şartlarında uzun süre muhafaza edilen kültürlerde fenazin pigmenti üretiminin kararsız olduğu görülmüştür.

İndigoindin üretimi, *P. indigofera*'nın özel bir karakteridir. Bu tür tarafından indigoindin üretimini zenginleştirmek için iyi bir besiyeri Sommer ve arkadaşları (92) tarafından formüllendirilmiştir.

1.8.3. Poli-β-hidroksibutirat (PHB) Birikimi

PHB birikimi *Pseudomonas*'ları, PHB biriktiren ve biriktirmeyen diye iki büyük gruba ayırır. *Pseudomonas*'ların rRNA'larına göre ayırımları sonucu oluşan gruplardan RNA grup II ve III PHB biriktiren pseudomonadların toplandığı gruplardır.

PHB'nin birikimi, amonyum klorür bileşeni modifiye edilmiş Palleroni ve Doudoroff (92) tarafından tanımlanan sıvı besiyerinde arttırılabilir. Besiyeri, %0.5 konsantrasyonda, DL-β-hidroksibutirat olan tek bir karbon kaynağı ile katkılanmıştır. Besiyerinin düşük azot içeriği protein sentezini arttırır ve karbon bileşeni polimer içinde tercihli olarak değiştirilebilir.

1.8.4. PHB Hidrolizi

PHB, ekstrasellular bir enzim tarafından hidroliz edilir. Bu enzimin üretilmesi bakterilere ilave bir özellik katar ve PHB'ı karbon ve enerji kaynağı olarak kullanan bakterileri kullanmayanlardan ayırır.

PHB hidrolizinin testi Delafield ve arkadaşları (93) tarafından açıklanmıştır. Su içerisindeki PHB granüllerinin homojen süspansiyonu, bir Potter-Envehjen homojenizatör ve sonik osilatör yardımıyla sağlanır. Kaplanan PHB petrileri, 50°C'de ısıtılmış bir mineral agar petrisine 4 ml 5 mg dağılmış polimer ihtiva eden %2'lik agarın dökülmesiyle hazırlanır. Kaplama polimer agar otoklavda steril edilebilir.

1.8.5. Testosteron Parçalanması

Bazı *Pseudomonas*'lar büyümeleri için testosteronu karbon kaynağı olarak kullanır. Testosteronun parçalanmasında da PHB hidrolizine benzer bir test sistemi uygulanır. Distile sudaki testosteron süspansiyonu, iyi bir dağılım sağlamak ve kontaminasyonların sayısını azaltmak için sonike edilir. Süspansiyonun yüzeyi kaplaması için agar ihtiva eden Petrilere dökülür ve kullanıma hazır hale getirilir.

1.8.6. Ring Füzyon Mekanizması

Aromatik bileşiklerin (katekol ve protokatekol) metabolizmalarında bileşiğin *orto* veya *meta*'ya bölünmesi Stanier ve arkadaşları (89) tarafından önerilen orjinal metot ile belirlenmiştir. Hücreler modifiye edilmiş besiyerilerde büyütüldükten sonra, aromatik bileşikler ve 2 ml ya 0.1 M katekol veya 0.1 M protokatekolat ilave edilir. Kısa bir süre (genellikle 5")'de görülen parlak sarı renk oluşumu bileşiğin bakteriler tarafından *meta* bölünmeye uğratıldığını gösterir. Gerekli şartlar sağlandıktan sonra koyu mor renk oluşumu da *orto* parçalanmayı gösterir. Böylece, bakterilerin aromatik bileşikleri *meta* ve *orta* pozisyonunda parçalayıp parçalamadığı tespit edilir.

1.8.7. Arjininin Hidrolizi

Bakterilerin arjinini hidrolize etmesi PHB birikiminden sonraki testlerin en önemlilerinden biridir. PHB biriktiren ve biriktirmeyen *Pseudomonas*'ları arjinin hidrolize eden ve etmeyen diye gruplara böler. Bu işlem için Thornley'in (94) metodu en uygun yöntemdir. Thornley'in besiyeri 5 ml'lik vida kapaklı şişede 3 ml'lik hacimlere bölünür. Otoklavlandıktan sonra şişeleri delerek inkübasyon yapılır ve erimiş parafin ile kaplanır. Anaerobik şartlarda, arjininden amonyum oluşumu 3 günde indikatör rengin değişmesiyle belirlenir. Amonyum oluşumu da arjinini hidrolizi eden bakterileri belirler.

1.8.8. Karbohidratlardan Asit Üretimi

Karbohidratlardan asit üretimi son yıllarda tanımlama amacıyla çok fazla kullanılmaktadır. Bu sayede bakterilerin hem karbohidratları kullanmaları hem de karbohidratlardan asit üretilip üretilmediği belirlenir. Bu nedenle burada dikkat edilmesi gereken durum, sonuçlarının yorumlandığı prosedürlerin doğru seçimi ve sonuçların doğru yorumlanmasıdır. Seçilen metod, Hugh ve Leifson (95) tarafından tanımlanmış ve açık ve tekrarlanabilir sonuçlar vermektedir. Hugh-Leifson besiyerinin asıl avantajı peptonun çok düşük konsantrasyonunda kullanılmasıdır. Pepton konsantrasyonu yüksek olduğu zaman, deaminasyona uğraması şekerden pozitif asit üretimini nötralize edebilir.

1.8.9. Tween 80 Hidrolizi

Bu testte tween 80'i hidrolize eden yani lipaz üreten bakterileri tespit etmeye yarar. Reaksiyon lipolitik aktivitenin bir göstergesidir. Sierra (96) tarafından teklif edilen bir besiyeride tanımlanmıştır. Besiyeri genellikle petri tabağına yayılır ve inkübasyon esnasında petriyer günlük olarak çözünmeyen kalsiyum sabunlarının oluşumundan dolayı kolonilerin etrafında şeffaf noktaların oluşumu gözlenir. On günde reaksiyon negatif ise bakteriyal kümeler kazınarak silinir ve kolonilerin altındaki besiyeri, çökelek oluşumu için incelenir. Bununla birlikte böyle bir pozitif reaksiyonun yorumu kolay değildir.

2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

2.1. Materyaller

İzolatların büyütülmesi için bakteriolojik agar, brain heart infüzyon (BHI) agar jelatin, maya ekstraktı, mineral salt medium (MSM) agar, Müller Hilton agar (MHA), Müller Hilton broth (MHB), nişasta, nütrient agar, nütrient broth, pepton, *Pseudomonas* izolasyon agar (PIA), triptik soy agar (TSA) ve triptik soy broth (TSB) besiyerileri kullanıldı.

Ayrıca, çalışmada kimyasal madde olarak akrilamid, amonyum asetat, amonyum oksalat, amonyum persülfat, L-Arginin, aseton, bis-akrilamid, bovin serum albumin (BSA), demir sülfat, diamonyum hidrojen fosfat, p-dimetil amino benzaldehit, dimetil α -naftolamin, etilen diamintetraasetik asit (EDTA), fenantren, fenol, gliserol, glisin, izoamilalkol, kloroform, mağnezyum sülfat, metanol, potasyum asetat, potasyum klorür, sodyum dodesil sülfat (SDS), sodyum hidroksid, sodyum klorür, sodyum propionat, sulfonilik asit, tannik asid, tris bazı, trisodyum sitrat, üre, boya ve ayıraç olarak brom fenol mavisi, coomassie brilliant mavisi-G 250, coomassie brilliant mavisi-R 250, fenol kırmızısı, kristal viyole, metilen mavisi ve safranin ve çeşitli antibiyotikler (ampisilin, aztreonama, gentamisin, kloramfenikol, oksasilin, penisilin G, streptomisin, sulfamethoksa, tetrasiklin, tobramisin) kullanıldı.

2.2. Yöntem

2.2.1. İzolatların Elde Edilmesi

2.2.1.1. Toprak Örneklerinin Alınması ve Bakteri Sayılarının Belirlenmesi

Örnekler fuel oil bulaşmış topraktan kuru, yarı kuru ve çamurlu ve kontrol olarak steril şişelere steril malzemeler kullanılarak alındı. Laboratuara getirilen örneklerden 10'ar g 40 ml triptik soy broth içinde süspansiyon haline getirildi (97). Örneklerdeki bakteri sayılarının belirlenmesi için 10 ml süspansiyon süzüldü ve 10 ml triptik soy broth

(2X) ile yıkandı. Oluşan süzölmüş karışımdan 5, 10, 20 ve 50 µl'lik hacimlerde triptik soy agar petrilere yayma ekim yapıldı. Petriler 30°C'de 1 gün inkübasyona tabi tutuldu. Bu süre sonunda oluşan bakteriyal koloniler sayıldı ve istatistiksel olarak geçerli koloni sayılarının (25-250 koloni/petri) bulunduğu petriler üzerinden hesaplamalar yapılarak 1 g örnekte bulunan toplam bakteri sayısı belirlendi.

2.2.1.2. Farklı İzolatların Belirlenmesi ve Saf Kültürlerin Hazırlanması

Bir önceki basamakta oluşturulan süspansiyon 30°C'de, 150 rpm'de, 6 saat sallandı. Karışımın 10 ml'si süzgeç kağıdından geçirilerek süzöldü. Süzölmüş karışımdan 5, 10, 20 ve 50 µl'lik hacimlerde triptik soy agar petrilere yayma ekim yapıldı. Petriler 30°C'de 1 gün inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda triptik soy agar petrilere büyüyen koloniler binoküler mikroskop altında incelenerek koloni morfolojileri ve renklerine göre farklı koloniler tespit edildi. Bu farklı kolonilerden triptik soy agar petrilere yeniden çizgi ekim yapıldı ve böylece saf kültürler hazırlandı. Birbirinden morfolojik olarak farklı olan izolatlar çeşitli boyama ve ayırt etme testlerine tabi tutuldu ve çeşitli özellikleri belirlendi.

2.2.2. İzolatlardan *Pseudomonas* Cinsine Dahil Olanların Belirlenmesi

2.2.2.1. *Pseudomonas* İzolasyon Agarda Büyüme

Elde edilen izolatların hepsi çizgi ekim yöntemiyle *Pseudomonas* izolasyon agara (PIA) ekildi. Petrilerin 30°C'de 2 gün inkübasyonu sonunda PIA'da büyüyen izolatlar tespit edildi.

2.2.2.2. Gram Boyama

Bakterileri iki büyük gruba ayıran gram boyama için genç (24 saatlikten az) bakteri kültüründen bir miktar alınarak lam üzerine yayıldı. Açık havada kurutulduktan sonra alevden geçirilerek tespit edildi. Daha

sonra kristal viyoleye maruz bırakılıp, lügol ile yıkandıktan sonra tekrar lügol ile muamele edildi. Aseton-alkolle renk giderildikten sonra safranine maruz bırakıldı. Deiyonize su (dH₂O) ile yıkandıktan sonra açık havada kurutularak mikroskop altında incelendi. Mor renkli olarak boyanan bakterilerin gram olumlu, pembe renkli olarak boyanan bakterilerin ise gram olumsuz olduğuna karar verildi (97).

2.2.2.3 Katalaz Testi

Mikroorganizmaların aerobik solunum sırasında oluşan hidrojen peroksit (H₂O₂), katalaz adı verilen enzimler yardımıyla yıkılarak hücrelerden uzaklaştırılır. İzolatların katalaz enzimini üretip üretmediklerini tespit etmek için triptik soy agar besiyeri hazırlandı. İzolatlar bu besiyeriye inoküle edildikten sonra 24-48 saat 30°C'ye ayarlanmış etüvde inkübe edildi. İnkübasyondan sonra üzerine %10'luk H₂O₂ çözeltisi ilave edildi ve oluşan gaz kabarcıklarına göre testin pozitif veya negatif olduğuna karar verildi (97).

2.2.2.4. Pigmentasyon

İzolatlar çizgi ekim yöntemiyle King ve arkadaşlarının (91) A ve B besiyerilerine, Gray'ın besiyerine ve potato dekstros agar besiyerine yapıldı. Petriler, 30°C'de 3-4 gün inkübe edildi. Büyüyen koloniler UV ışık altında incelendi ve pigment oluşumları gözlenmeye çalışıldı.

2.2.3. *Pseudomonas* Cinsine Dahil Olan İzolatların Çeşitli Boyama ve Morfolojik Özelliklerinin Belirlenmesi

2.2.3.1. Basit Boyama

Elde edilen izolatların hücre şekillerinin belirlenmesi amacıyla izolatların basit boyamaları yapıldı. Bu amaçla, lam üzerine yayılan bakteri kültürleri açık havada kurutulduktan sonra alevden geçirilmek suretiyle tespit edildiler. Tespit işleminden sonra lam üzerine kristal viyole boya solüsyonu ilave edildi, 3-4 dakika beklendikten sonra, dH₂O ile yıkandı. Preparatlar kurutulduktan sonra mikroskop altında incelendiler.

2.2.3.2. Hareket Testleri

İzolatların hareketli olup olmadıklarının ortaya çıkarılması için "Lam-lamel arası preparat" tekniği kullanıldı (97). Bu teknikte izolatlardan hazırlanan kültürlerden bir öze dolusu alındı ve temiz bir lam üzerine bırakıldı ve lamel ile kapatıldı. Yapılan bu preparat mikroskopta incelendi ve izolatların hareketli olup olmadıklarına karar verildi.

2.2.3.3. İzolatların Boyutlarının Hesaplanması

İzolatlar basit boya ile boyandı ve bu preparatlardan mikrometre takımları kullanılarak izolatların en ve boy uzunlukları hesaplandı.

2.2.4. *Pseudomonas* Cinsine Dahil Olan İzolatların Fizyolojik Özelliklerinin Belirlenmesi

2.2.4.1. İzolatların Büyüme Sıcaklıklarının Belirlenmesi

Elde edilen izolatların maksimum ve minimum büyüme sıcaklıklarının belirlenmesi için bakteriler nütrient agar slantları üzerine ekildiler. Kültürler, 4 ve 41 °C'lerde inkübe edildiler.

İzolatların optimum büyüme sıcaklıklarının belirlenmesi amacıyla nütrient broth içinde yapılan gece kültürlerinden $OD_{600}=0.1$ olacak şekilde yeniden nütrient broth'a ekim yapıldı. Hazırlanan kültürler 30, 34 ve 37 °C'lerde belli bir süre sallayıcıda sallanarak büyütüldüler. Hazırlanan bu kültürlerden her saat örnekler alınarak spektrofotometre (OD_{600})'de absorbans değerleri ölçülerek bakterilerin optimum olarak büyüdüğü sıcaklıklar tespit edildi (98).

2.2.4.2. İzolatların Büyüebildiği pH Aralıklarının Belirlenmesi

İzolatların büyüebildiği pH aralığının belirlenmesi için izolatlar değişik pH değerlerine (4.5, 5.0, 6.0, 9.0, 10.0, 11.0 ve 11.5) sahip nütrient broth'lara inoküle edildi ve optimum büyüme sıcaklıklarında üç gün inkübe edildiler. İnkübasyon neticesinde kültürlerde üreme olup

olmadığı spektrofotometre (OD₆₀₀)'de ölçülerek belirlendi. Böylece, izolatların büyüebildikleri maksimum ve minimum pH değerleri tespit edildi.

İzolatların hangi pH değerinde optimum olarak büyüdüğünün ortaya çıkarılması için herbirinin büyüebildiği pH değerine sahip olan nütrient broth besiyerlerine OD₆₀₀=0.1 olacak şekilde gece kültürlerinden aşılama yapıldı. Her saat spektrofotometrede ölçümler yapılarak optimum büyümenin meydana geldiği pH değerleri belirlendi (97).

2.2.4.3. İzolatların NaCl İhtiyaçlarının Belirlenmesi

İzolatların NaCl ihtiyaçlarının belirlenmesi amacıyla %3, 5, 7, 9 ve 10 oranlarında NaCl ihtiva eden nütrient broth besiyerleri hazırlandı. Bunun 4 mililitresine her izolattan ekim yapıldı. Kültürlerin 30°C'de, 7 ve 14 gün inkübasyonundan sonra üremenin olduğu tuz oranı tespit edildi (97).

2.2.4.4. İzolatların Atmosferik Oksijen İhtiyaçlarının Belirlenmesi

İzolatların atmosferik oksijen ihtiyaçlarının belirlenmesi amacıyla hazırlanan brain heart infüzyon agar besiyeri deney tüplerine dağıtıldı, steril edildikten sonra 50°C'ye kadar soğutuldu. Her izolattan tüplere ekim yapıldı ve çevirilerek karıştırıldı, sonra hemen soğuk suya daldırılarak donması sağlandı. Daha sonra 30°C'de bir gece inkübe edildi ve tüp içerisinde üredikleri bölgelere bakılarak, izolatların oksijen ihtiyaçları hakkında karar verildi (98).

2.2.5. *Pseudomonas* Cinsine Dahil Olan İzolatların Çeşitli Biyokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi

2.2.5.1. Nişasta Hidrolizi Testi

İzolatların, yüksek moleküler ağırlığa sahip bir molekül olan nişastayı parçalayan "amilaz" enzimi üretilip üretmediklerinin test edilmesi için izolatlar nişasta agar petrilere çizgi yöntemiyle ekildi. Kültürler 30°C'de, 2 gün inkübasyondan sonra büyüyen bakterilerin üzerine lügol

damlatıldı. Koyu kahve rengin oluşumu nişastanın hidroliz olduğunu, mavi rengin oluşumu ise nişastanın hidroliz olmadığını gösterdi (97).

2.2.5.2. Jelatin Hidrolizi Testi

Zorunlu aminoasitlerden biri olan triptofanı ihtiva etmeyen bir kollajen olan jelatinin izolatlar tarafından hidrolize edilip edilmediğinin belirlenmesi için hazırlanan nütrient jelatin besiyeri, steril deney tüplerine döküldü. İzolatlardan herbiri, bu deney tüplerine ekildikten sonra, 30°C'de 3 gün inkübe edildi. İnkübasyondan sonra tüpler, 4°C'de yaklaşık 1 saat bekletildi. Bu süre sonunda besiyerinin sıvı ya da katı oluşuna göre testin pozitif veya negatif olduğuna karar verildi. Bu süre sonunda jelatinin sıvı olması jelatinin parçalandığını, yani jelatinaz enzimi üretildiğini gösterir (97).

2.2.5.3. Karbohidrat Fermentasyon Testleri

Çoğu mikroorganizmalar, hayatlarını devam ettirebilmeleri için gerekli olan enerjiyi çeşitli karbohidratları da içine alan substratların biyooksidasyonunu meydana getiren enzimatik reaksiyonlardan sağlamaktadırlar. İzolatların bazı karbohidratları fermente edip etmediklerinin ortaya çıkarılması amacıyla karbohidrat fermentasyon besiyerileri hazırlandı. Bu besiyerilere, izolatlar tarafından kullanılıp kullanılmadığı öğrenilmek istenen karbohidratlar ve pH indikatörü olarak bir boya da ilave edildi. Her izolat, hazırlanan karbohidrat fermentasyon besiyerilerine ekildi. Uygun sıcaklıkta 7 gün inkübe edildikten sonra, besiyerinde meydana gelen koyu pembeden sarı renge değişim organizmaların kullanılan şekeri fermente ettiğini, herhangi bir değişikliğin olmaması ise şekerin organizma tarafından karbohidrat kaynağı olarak kullanılmadığını göstermektedir (97).

2.2.5.4. Voges-Proskauer Testi

Voges-Proskauer testi, bazı organizmaların, glukoz metabolizması sonucu meydana gelen asidik olmayan veya nötral son ürünleri üretebilme kabiliyetinin ortaya çıkarılması için yapılmaktadır. Bu testin gerçekleştirilmesi için Voges-Proskauer broth besiyeri hazırlandı.

Besiyerinin 4 mililitresine her izolattan ekim yapıldıktan sonra 30°C'de, 3 gün inkübe edildi. Bu süre sonunda kültürlerin üzerine Voges-Proskauer ayırıcı ilave edildi. Tamamen karıştırıldıktan sonra oda sıcaklığında 1 saat bekletildi. Sonuçta kültür yüzeyinde kırmızı renk oluşumu testin pozitif sonuç verdiğini, oluşmaması ise negatif sonucu göstermektedir (97).

2.2.5.5. Sitrat ve Propionat Kullanım Testi

Mikroorganizmalar ortamda fermente edebilecekleri glukoz veya laktozu bulamadıklarında gerekli olan enerjiyi sağlamak için ortamda bulunan sitrat veya propionatı kullanırlar. İzolatların bu molekülleri kullanıp kullanmadığının ortaya çıkarılması amacıyla sitrat ve propionat kullanım besiyerileri hazırlandı. Her izolat hazırlanan bu besiyerilere ekildi ve 30°C'de 3 ve 7 gün inkübasyona bırakıldı. Bu süre sonunda besiyeride üreme ve renk değişikliği olup olmadığına bakıldı. Eğer mavi renge bir dönüş varsa organizmaların sitrat ve propionatı karbon kaynağı olarak kullandığı sonucuna varıldı (97).

2.2.5.6. Nitratı İndirgeme Testi

İzolatların nitratı indirgeyip indirgemediğinin ortaya çıkarılması için nitrat broth besiyeri hazırlandı ve bu besiyerinin 4 mililitresine inkübasyon yapılarak, kültürler 30°C'de, 48 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan sonra kültürlerin üzerine 5 damla solüsyon A (Sülfolinik asit) ve 5 damla solüsyon B (Dimetil- α -naftil amid) ilave edilip, tüpler çalkalandı. Damlatmayla birlikte 30 saniye içerisinde kırmızı-pembe renk oluşumu pozitif sonuçtur ve ortamda nitritin mevcut olduğunu gösterir. Kırmızı renk oluşmadığı durumlarda ortama çok az çinko tozu ilave edildi. Çinko tozu ileva edildikten sonra kırmızı renk oluşursa, bu kez sonuç negatiftir. Eğer renk değişimi olmazsa, nitratın indirgenmesi için yine pozitif sonuçtur (97).

2.2.5.7. Oksidaz Testi

Oksidaz testi çizgi ekim metoduna (97) göre yapıldı. Bu testin yapılabilmesi için triptik soy agar besiyeri hazırlandı. İzolatlar çizgi

ekim yöntemiyle bu besiyeriye ekildi ve 30°C'de 24-48 saat inkübe edildi. Bu süre sonunda büyüyen kolonilerin üzerine oksidaz testi ayıracı damlatıldı. Siyah renk oluşumu testin pozitif olduğunu gösterir.

2.2.5.8. Tween 80 Hidrolizi

Tween 80 hidrolizi Sierra (96)'a göre yapıldı. İzolatlar, tween 80 ihtiva eden besiyerinin bulunduğu Petrilere çizgi ekim yöntemiyle ekildi ve 30°C'de inkübasyona bırakıldı. Büyüyen kolonilerin etrafında günlük olarak, çözünmeyen kalsiyum sabunları oluşumu takip edildi. Bu yapıların 10 gün içinde oluşmadığı durumda koloniler kazınarak, altlarında çökelek oluşumu arandı. Aranılan yapıların oluşumu tween 80'in hidroliz edildiğini gösterdi.

2.2.5.9. Arjinin Hidrolizi

Bu işlem için en uygun metot Thornley (94)'in geliştirdiği metodudur. Çalışmada bu metot ile aynı kişi tarafından tavsiye edilen besiyeri kullanıldı. Thornley'in besiyerisi 5 ml'lik vida kapaklı şişelerde 3 ml olacak şekilde bölündü. Otoklavlandıktan sonra şişeler delinerek inokülasyon yapıldı ve erimiş parafin ile kapatıldı. Anaerobik şartlarda, arjininden amonyumun oluşumu 3 günde indikatör rengin değişmesiyle belirlendi.

2.2.6. İzolatların Polisiklik Aromatik Hidrokarbon (fenantren) Parçalama Özelliklerinin Belirlenmesi

Mineral salt besiyeri (MSM, 99) ihtiva eden Petrilere kürdan aracılığıyla nokta inokülasyonu yapıldı. Üzerine aseton içerisinde çözünmüş %1'lik fenantren solüsyonu püskürtüldü ve 30°C'de 2 gün inkübasyona bırakıldı. Bu süre sonunda nokta inokülasyonların etrafında şeffaf bölge oluşumunu görebilmek için gözlem yapıldı (100).

2.2.7. İzolatların Plazmid DNA'larının İzolasyonu

İzolatların plazmid içerikleri Voskuil ve Chambliss'in (101) geliştirdiği metoda göre ortaya çıkarıldı. Her izolattan 5-10 ml olarak

hazırlanan gece kültürleri 10.000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant atıldı ve çökelek 200 µl SET tamponunda (%25 sakkaroz, 50 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl, pH 8.0) vortekslenerek çözüldü. Kullanılan SET tamponunun 1 ml'sine 5 mg lizozim ilave edildi. Daha sonra, karışım mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı ve 37°C'de 10 dakika inkübe edildi. Üzerine 350 µl yeni hazırlanmış sodyum hidroksit-sodyum dodesil sülfat solüsyonundan (0.2 N NaOH, %1 SDS) ilave edildi. Süspansiyon şeffaf bir durum alıncaya kadar ters düz çevrildi ve şeffaf süspansiyona 350 µl soğuk 3 M K⁺-5 M asetat solüsyonundan ilave edildi. Süspansiyon, mikrosantrifüjün en yüksek hızında (16.000 x g), 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant yeni bir mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı ve alınan sıvıya 650 µl soğuk fenol:kloroform:izoamilalkol (25:24:1) karışımı ilave edildi. Bir dakika vortekslenerek karıştırıldı. Daha sonra karışım 5 dakika mikrosantrifüjde santrifüj edildi. Üst faz alındı ve buna 620 µl soğuk kloroform:izoamilalkol karışımından ilave edildi, 30 saniye vortekslenerek karıştırıldı ve karışım mikrosantrifüjde 3 dakika santrifüj edildi. Üst faz (550 µl) pipetörle alınıp yeni bir tüpe aktarıldı ve üzerine eşit miktarda soğuk (-20°C) izopropanol ilave edildi. Karışım ters düz çevrilerek tamamen karıştırıldıktan sonra, 5 dakika santrifüjlendi. Süpernatant kısmı döküldü ve izopropanol açık havada uçurulduktan sonra çökelek kısmı %70'lik etanol ilave edilerek 2 dakika santrifüjlendi, kalan etanol açık havada uçurulduktan sonra 50 µl dH₂O'da çözüldü.

Yapılan plazmid DNA'sı izolasyonu çalışması sonucunda, plazmid DNA'larının izole edilip edilmediğinin ortaya çıkarılması için 0.5 µg/ml etidium bromür içeren %0.7'lik agaroz jel hazırlandı. Yürütülecek örneklerin hazırlanması için 5 µl DNA solüsyonu, 1 µl 10X yürütme boyası ve 4 µl dH₂O veya TE tamponu bir mikrosantrifüj tüpünde birleştirildi ve oluşan karışımlar agaroz jel üzerinde oluşturulan her bir kuyucuğa ayrı ayrı yüklenerek 100 voltluk elektrik alanda, fragment ağırlıkları belli olan bir şahit DNA ile yürütüldüler. Yürütme neticesinde, plazmid DNA'larının var olup olmadıkları ve varsa moleküler ağırlıkları tespit edildi.

2.2.8. İzolatların Total Hücre Protein Profilinin Çıkarılması

2.2.8.1. Total Hücre Proteinlerinin İzolasyonu

İzolatların ihtiva ettikleri proteinlerin profilini çıkarmak için, her izolattan 10 mililitrelik gece kültürleri hazırlandı. Hücreler, 14.000 rpm'de 15 dakika santrifüj edildi. Çökelek, 50 mM Tris-HCl (pH 7.4) ve %10 sukkarozdan oluşan TS'de çözüldü. Karışım, -194°C'de 1 dakika bekletildikten sonra oda sıcaklığına alındı ve bu işlem iki kez tekrarlandı. Oda sıcaklığında çözüldükten sonra hacminin 1/20'si kadar 10 mg/ml'lik lizozim ilave edildi. Hücre süspansiyonu 35 dakika buz üzerinde bekletildikten sonra, 30 dakika, 16.000 x g'de santrifüj edildi. Protein özütünü ihtiva eden sıvı kısım, -20°C'de kullanılıncaya kadar muhafaza edildi.

2.2.8.2. Protein Konsantrasyonunun Tayini

Protein konsantrasyonu, Bradford metodu (102) ile tayin edildi. Protein konsantrasyonu, spektrofotometrik olarak 595 nm dalga boyunda alınan değerlere göre hesaplandı. Önce, spektrofotometre coomassie brilliant mavisi-G250 (CBB-250) ve 0,15 M'lık NaCl'den oluşan çözelti (kör) ile sıfırlandı. Numuneler ölçüm için hazırlandıktan sonra iyice karıştırıldı ve 2-60 dakikalık zaman aralığında spektrofotometrede arasında değerleri okundu. Standart konsantrasyon eğrisi, farklı miktarda BSA içeren numunelerin ölçülmesiyle elde edildi. Konsantrasyonu bilinmeyen numunelerin konsantrasyonu, konsantrasyonu bilinenlerin verdiği absorbans değerinin, standart eğrisi üzerine çakıştırılması ile bulundu. Bulunan bu değerlerden faydalanılarak numunelerdeki protein konsantrasyonları hesaplandı.

2.2.8.3. SDS-Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi

Miktarları tayin edilmiş olan 5 adet izolatın (5, 11, 21, 24 ve 38 nolu izolatlar) protein özütlerinden uygun miktarlarda (50 mg) alındı. Bu özütlere eşit miktarda 2X muamele tamponu (0.15 M Tris-HCl pH 6.8, %4 SDS, %20 Gliserol, %6 β-merkaptolanol) ilave edildikten

sonra, nümuneler 65°C'de 90 saniye bekletildi. Laemmli (103) tarafından tanımlanan %12'lik sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jeline (SDS-PAGE) yüklendi ve 0.75 mm kalınlığındaki her bir jel için 15 mA akım uygulanarak ayırma işlemi gerçekleştirildi.

Yürütme işlemi tamamlandıktan sonra, jel coomassie brilliant mavisi (%0.125 coomassie brilliant mavisi R-250, %50 metanol, %10 asetik asit) boyası ile 2-4 saat boyandı. Yıkama-I (%50 metanol, %10 asetik asit) solüsyonunda 1 saat bekletildikten sonra, Yıkama-II (%7 asetik asit, %5 metanol) solüsyonuna aktarıldı. En iyi jeller seçilerek iki selofan yaprak arasına alındı ve 80°C'de, 2 saat, vakumlu jel kurutucuda kurutulularak daimi olarak saklanabilecek hale getirildi.

2.2.9. Çeşitli Antibiyotiklerin İzolatlar zerindeki Etkilerinin Belirlenmesi

Çalışmada Bauer-Kirby tarafından kullanılan Müller Hilton agar (MHA) ve Müller Hilton broth (MHB) besiyeri "National Committiee for Clinical Laboratory (NCCLS)" tarafından antibakteriyal çalışmalar için standart olarak kabul edilen test kullanıldı (104). Agar difüzyon yöntemi uygulandı. Gece kültürleri OD₆₀₀=0.1'e kadar büyütüldü ve bunlardan triptik soy agar ihtiva eden petrilere swapla ekim yapıldı. Bir petriye 5 tane olacak şekilde antibiyotik emdirilmiş hazır diskler (ampisilin-10 mg, aztreonama-30 mg, gentamisin-10 mg, kloramfenikol-30 mg, oksasilin-5 mg, penisilin G-10 mg, streptomisin-10 mg, slfamethoksa-25 mg, tetrasiklin-30 mg, tobramisin-10 mg) yerleştirildi ve 30°C'de 24 saat inkübasyondan sonra inhibisyon çapları ölçülerek hassaslık/dirençlilik değerleri tespit edildi (105).

3. BULGULAR

Çalışmada fuel oil bulaşmış bir depolama sahasından alınan toprak örneklerindeki *Pseudomonas* cinsine ait bakteriyal izolatlar belirlendi. Bunlar arasında polisiklik aromatik hidrokarbon (PAH)'ları parçalayanlar tespit edildi. Belirlenen izolatların morfolojik, boyama, fizyolojik, biyokimyasal, moleküler ve kemotaksonomik özellikleri aydınlatıldı.

3.1. Alınan Toprak Örneklerinin Kantitatif Analizi

Yayma ekim sonucu, sayım için gerekli koloni sayısı 25-250 arasında bulunan petriler dikkate alınarak, koloni sayım yöntemine göre hesaplamalar yapıldı. Hesaplama sonunda her örneğin 1 ml'lik süspansiyonunda kuru toprakta 7.7×10^3 , yarı kuru toprakta 1.9×10^5 , çamurlu toprakta 3.2×10^4 ve kontrolde 6.5×10^3 bakteri bulunduğu tespit edildi. Bir başka deyişli, g başına kuru toprakta 3.08×10^4 , yarı kuru toprakta 7.6×10^5 ve çamurlu toprakta 1.28×10^5 ayrıca, kontrolde de 2.6×10^4 bakteri olduğu tespit edildi.

Farklı izolatların belirlenmesi için yapılan çalışmada öncelikle izolatların renklerine göre ayırım yapıldı. Daha sonra koloni morfolojileri çıplak göz ve binokülerle incelendi. Çalışmalar sonununda örnekleme noktalarında toplam 45 farklı bakteriyal izolat olduğu belirlendi.

Toplam 45 farklı izolatın 5 tanesinin (izolasyon sırasına göre 5, 11, 21, 24 ve 38 nolu izolatların) gram-negatif olmaları, *Pseudomonas* izolasyon agarda büyümeleri, katalaz enzimi üretmeleri, hareketli olmaları ve pigment üretmeleri gibi özelliklerinden dolayı *Pseudomonas* cinsine dahil olduğu belirlendi. İzolatların bahsedilen karakter özellikleri ilerideki çizelgelerde diğer özelliklerle birlikte verilecektir.

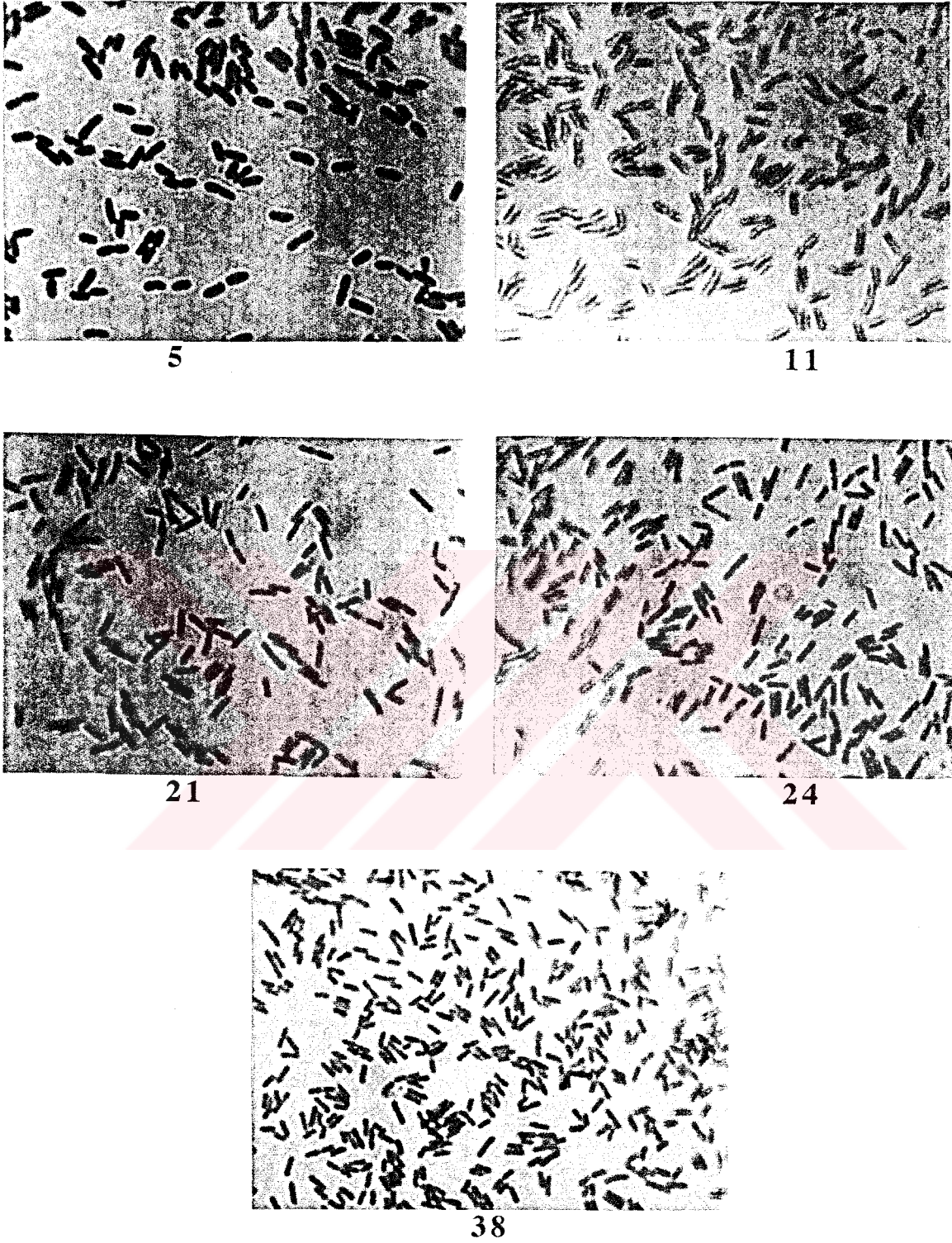
3.2. *Pseudomonas* Cinsine Ait Olan İzolatların Bazı Karakterlerinin Tayini

3.2.1. Morfolojik Karakterler

İzolatların çeşitli morfolojik özellikleri Çizelge 1'de gösterilmektedir. İzolatların ayırımında kullanılan pigment oluşturma özelliklerinde, 5 nolu izolatin beyaz, 11, 21 ve 24 nolu izolatların kahverengiye yakın, bazı pasajlarda da yeşilimsi ve 38 nolu izolatin da kahverengi pigment oluşturdıkları tespit edildi. İzolatların hepsinin fenazın ve piyoverdin pigment oluşumunda UV altında yeşil pigment ürettikleri gözlemlendi. Koloni şekli olarak 5 nolu izolatin yuvarlak ve yüksek diğerlerinin saçaklı ve çok dağınık bir koloni yapısına sahip oldukları tespit edildi. *Pseudomonas* cinsi özellikleri olan Gram boyama, hücre şekilleri ve hareket özellikleri izolatların hepsinde sırayla G-, basil ve hareketli olarak belirlendi. İzolatların çeşitli morfolojik özellikleri Çizelge 1'de, gram reaksiyonları ise Şekil 1'de gösterilmektedir.

Çizelge 1. *Pseudomonas* izolatlarının çeşitli morfolojik özellikleri

İzolat no	5	11	21	24	38
Örneğin kaynağı	kuru toprak	çamur	çamur	kuru toprak	çamur
TSA'daki rengi	beyaz	kahverengi ve yeşil	kahverengi ve yeşil	kahverengi ve yeşil	kahverengi
Pigment oluşumu					
fenazın (nor./UV)	krem/yeşil	kahve/yeşil	sarı/yeşil	sarı/yeşil	sarı/yeşil
piyoverdin (nor./UV)	krem/yeşil	kahve/yeşil	sarı/yeşil	sarı/yeşil	sarı/yeşil
PDA (nor./UV)	beyaz/yeşil	beyaz/yeşil	beyaz/yeşil	beyaz/yeşil	beyaz/yeşil
Koloni şekli	yuvarlak	çok saçaklı	çok saçaklı	çok saçaklı	saçaklı
Gram boyası	-	-	-	-	-
Hücre şekli	basil	basil	basil	basil	basil
Hücre boyut.(μm)	0.9 - 2.5	0.7 - 1.7	0.7 - 2.1	0.7 - 2.6	0.8 - 1.6
Hareket	+	+	+	+	+



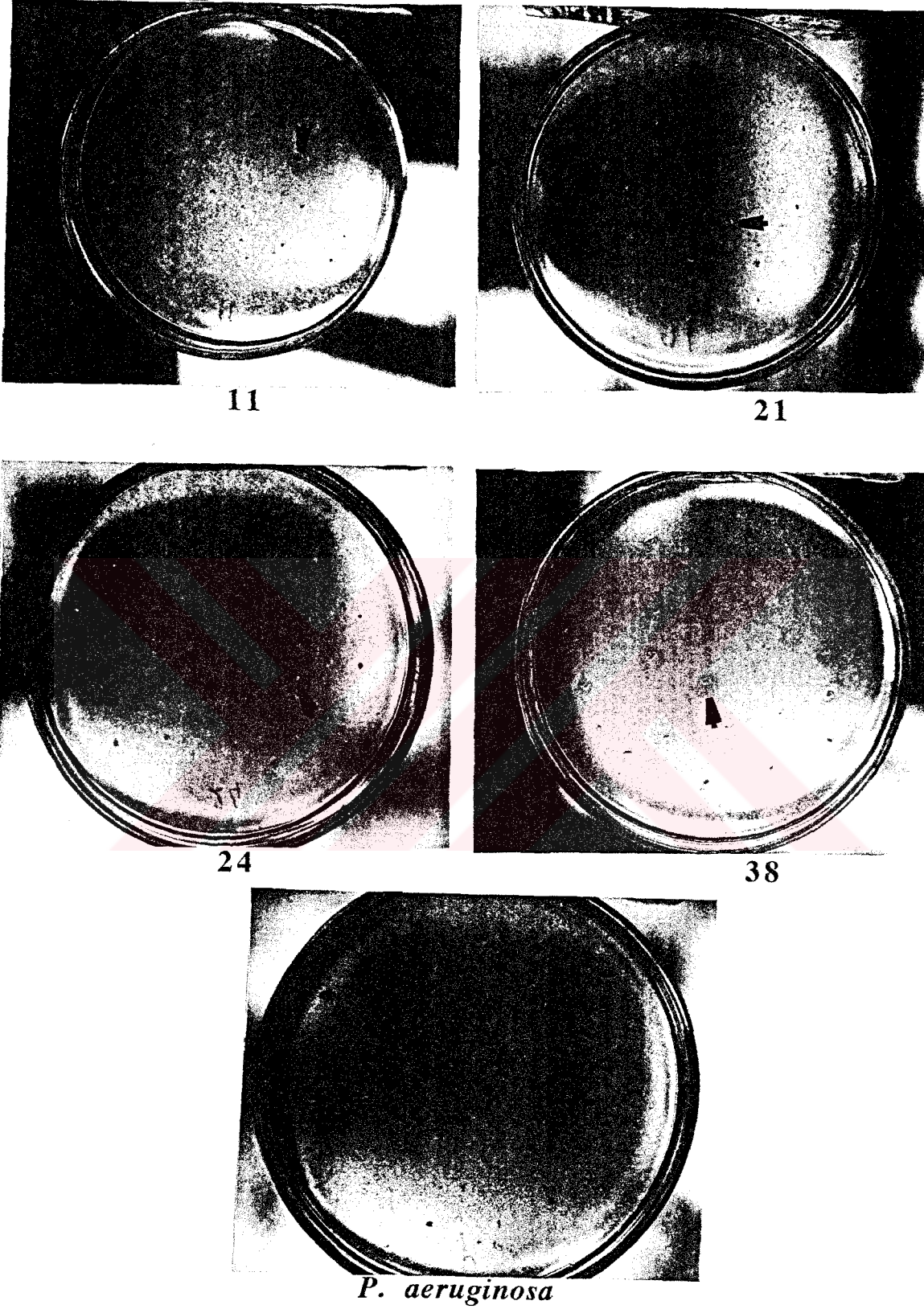
Şekil 1. *Pseudomonas* cinsine ait izolatların Gram boyamaları.
Rakamlar: izolat numaraları, Büyütme: 10 x 100

3.2.2. Fizyolojik Karakterler

Pseudomonas cinsine dahil olan izolatların çeşitli fizyolojik karakterleri Çizelge 2'de gösterilmektedir. İzolatların 4 tanesinin (11, 21, 24 ve 38 numaralı izolatlar) mineral salt besiyeri (MSM)'de çok az veya az büyüdüğü ancak, fenantren püskürtüldüğü zaman ise izolatların hepsinin normal olarak büyüdüğü belirlendi. Fenantren püskürtüldüğünde büyüyen 11, 21, 24 ve 38 numaralı izolatların nokta inokülasyonlarının etrafında şeffaf bölge oluşturdukları tespit edildi (Şekil 2). Bu durum, oluşan bu şeffaf bölgedeki fenantrenin bakteriler tarafından parçalandığını göstermektedir. İzolatların 5'inin de *Pseudomonas* cinsi özelliklerinden olan, PIA'da büyüdüğü ve sadece 21 numaralı izolatın büyüme faktörü ihtiyacı olduğu tespit edildi. İzolatların sıcaklık (4 - 41°C'lerde büyümeleri) ve pH büyüme sınırları ve optimum büyüme sıcaklık ve pH'ları da Çizelge 2'de belirtilmiştir. Ayrıca, izolatların büyüebildiği en yüksek tuz (NaCl) konsantrasyonları da 5 ve 38 numaralı izolatlar için %4 ve 11, 21 ve 24 numaralı izolatlar için %3 olarak belirlendi.

Çizelge 2. *Pseudomonas* izolatlarının çeşitli fizyolojik özellikleri

İzolat no	5	11	21	24	38
MSM'de büyüme	+	çok az	çok az	az	az
Fenantren'de büyüme	+	+	+	+	+
Şeffaf bölge oluşumu	-	+	+	+	+
PIA'da büyüme	+	+	+	+	+
Büyüme fak. ihtiyacı	-	-	+	-	-
4°C'de büyüme	+	+	-	+	-
41°C'de büyüme	-	+	+	+	-
Optimum büyüme (°C)	35 - 37	37	34	30 - 34	37
pH büyüme sınırı	5 - 10	5 - 11	5 - 10	5 - 10	5 - 9
Optimum büyüme pH'ı	7 - 7.5	7.5	7.5	7 - 8	7.5
Mak. NaCl sınırı (%)	4	3	3	3	4



Şekil 2. İzolatların fenantren parçalama özellikleri. Rakamlar: izolat numaraları, Ok: fenantrenin parçalanmış olduğu bölge

3.2.3. Biyokimyasal Karakterler

Belirlenen izolatlara ait bazı biyokimyasal karakterler Çizelge 3'te gösterilmektedir. Bu karakterlerden katalaz ve oksidaz enzimi üretimi *Pseudomonas* cinsi özelliklerindedir. İzolatların hepsinin katalaz ve oksidaz pozitif olduğu tespit edildi. Yine tüm izolatların nişasta parçalamaları, metil kırmızısı ve Vogus-Proskauer testlerinin negatif ve arjinin hidrolizi, sitrat ve eskulin kullanımı ve üreaz üretimi pozitif olarak belirlendi. Tween 80, jelatin ve indol testlerinde 11, 21 ve 24 numaralı, nitrat redüktaz testinde ise 11, 21, 24 ve 38 numaralı izolatların pozitif sonuçlar verdikleri tespit edildi. Ayrıca, izolatların çeşitli karbohidrattan asit üretip üretmedikleri de Çizelge 3'te gösterilmektedir.

Çizelge 3. *Pseudomonas* izolatlarının bazı biyokimyasal karakterleri

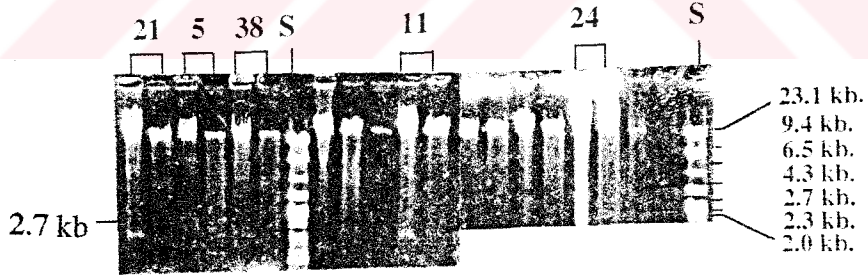
İzolat no	5	11	21	24	38
Katalaz üretimi	+	+	+	+	+
Oksidaz üretimi	+	+	+	+	+
Tween 80 hidrolizi	-	+	+	+	-
Arjinin hidrolizi	+	+	+	+	+
Jelatin hidrolizi	-	+	+	+	-
Sitrat kullanma	+	+	+	+	+
Nişasta parçalama	-	-	-	-	-
İndol üretimi	-	+	+	+	-
Nitrat redüktaz üre.	-	+	+	+	+
Üreaz üretimi	+	+	+	+	+
Metil kırmızısı testi	-	-	-	-	-
Vogus-Proskauer test	-	-	-	-	-
Eskulini kullanma	+	+	+	+	+
Karbohidrattan asit ü.					
D-Glukoz	+	+	+	+	+
Sukroz	-	-	-	-	-
L-Arabinoz	+	-	-	-	-
D-Ksiloz	-	büyümedi	büyümedi	büyümedi	büyümedi
D-Mannoz	+	-	-	-	-

3.3. İzolatların Polisiklik Aromatik Hidrokarbon Parçalayanlarının Belirlenmesi

İzolatların polisiklik aromatik hidrokarbonları parçalayıp parçalamadıklarını test etmek için yapılan çalışmada 11, 21, 24 ve 38 numaralı izolatların MSM'de nokta inokülasyonların etrafında şeffaf bölgeler oluşturdukları belirlendi (Bkz. Şekil 2). Bu bölgeler, petriye püskürtülen fenantrenin (asetonda çözülmüş ve %1'lik konsantrasyonda) nokta inokülasyonların etrafında parçalanmasıyla oluşur. Yani bakteri bu bölgedeki fenantreni parçalamış ve diğer bölgelere göre şeffaf görülmesini sağlamıştır. Bundan dolayı 11, 21, 24 ve 38 numaralı izolatların PAH'ları parçaladıkları tespit edilmiştir. *P. aeruginosa* fenantren parçalamayan bir bakteri olup, negatif sonuç gösterir.

3.4. İzolatların Plazmid İçerikleri

Bakterilerden izole edilen plazmidlerin %0.7'lik agaroz jelde yürütülmeleri sonucunda 11 ve 21 numaralı izolatlarda 2.7 kb büyüklüğünde birer plazmid olduğu tespit edildi (Şekil 3).

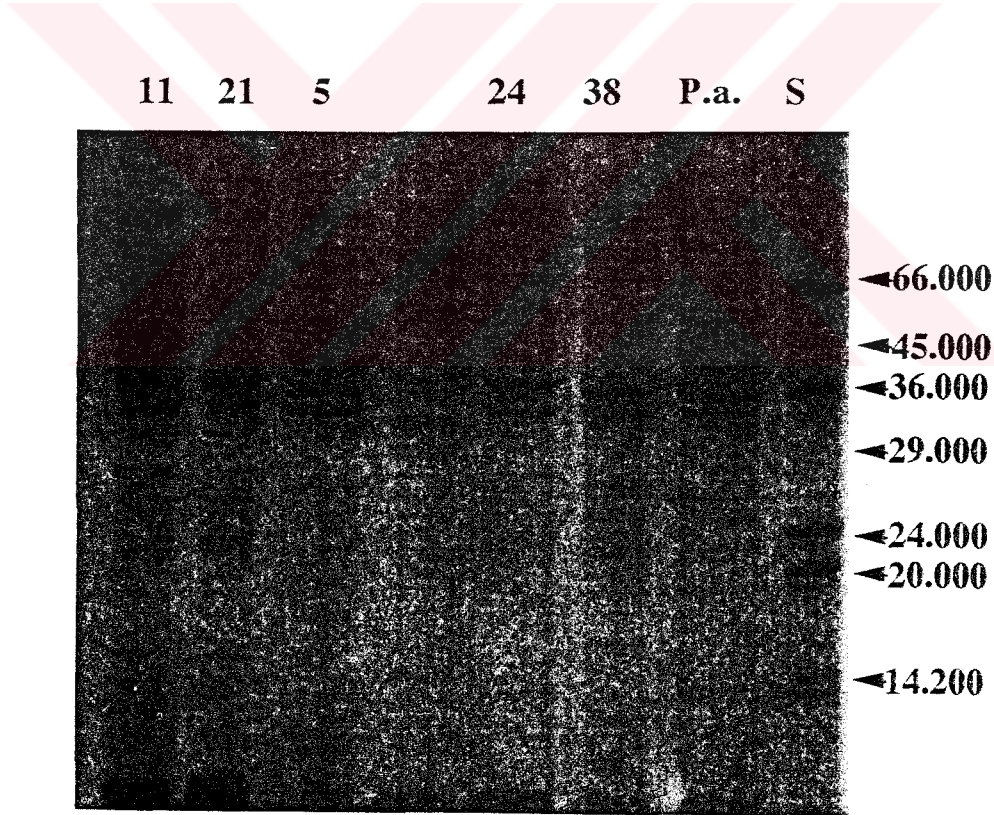


Şekil 3. İzolatların plazmid içeriklerinin %0.7'lik agaroz jeldeki görüntüleri. Rakamlar: izolat numaraları, S: moleküler ağırlıkları bilinen standart DNA fragmentleri

3.5. İzolatların Toplam Protein Profilleri

Elde edilen 5 izolattan ve kontrol olarak kullanılan *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC27853)'dan izole edilen çözünebilir proteinler, her

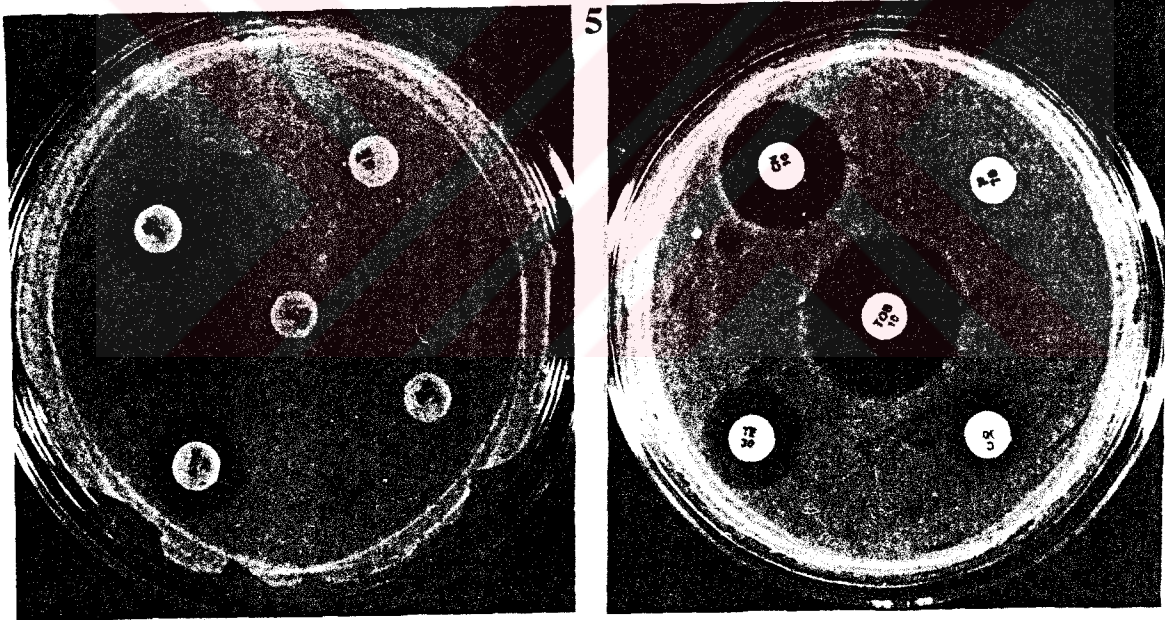
kuyuya 50 µg olacak şekilde, %12'lik SDS-PAGE jele yüklendi. 15 mA'lik elektrik akımında yürütülen proteinlerin oluşturmuş oldukları bantlar Şekil 4'te gösterilmektedir. Jelde elde edilen bantların birbirlerine benzerliklerinin ortaya çıkarılması için her izolattaki diğer izolata benzer bantlar sayıldı ve izolatin görülen tüm bant sayısına oranlanarak bulundu. Bu işlem sonucunda 11 ve 21 numaralı izolatlardan, bantlardan da anlaşıldığı gibi %91'lik benzerlik gösterdiği tespit edildi. Yine 11 nolu izolat ile 24 nolu izolat arasında da %80'lik bir benzerlik olduğu bulundu. 24 ve 38 numaralı izolatlarda arasında %60'a varan bir benzerlik olduğu tespit edildi. 5 numaralı izolatin 11 numaralı izolata %50, 38 numaralı izolata da %45 benzerlik gösterdiği belirlendi. 11 ve 21 numaralı izolatlardan *Pseudomonas aeruginosa*'ya benzerliğinin %50, 24 nolu izolatin %60, 5 nolu izolatin %50 ve 38 nolu izolatin %65 benzer olduğu tespit edildi.



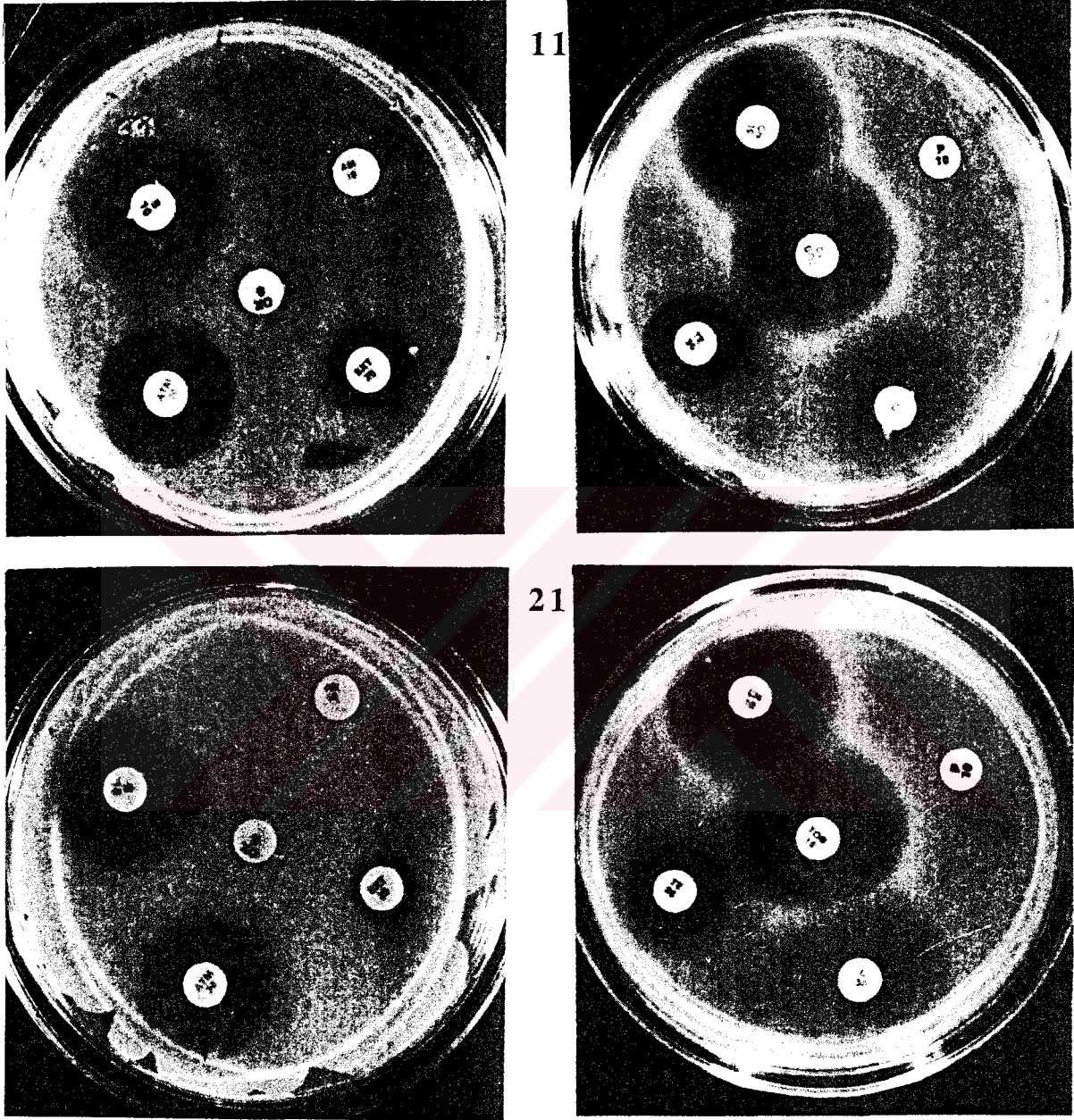
Şekil 4. İzolatların toplam protein profillerinin %12'lik SDS-Poliakrilamid jel elektroforeziyle belirlenmesi. Rakamlar: izolat numaraları, P.a.; *Pseudomonas aeruginosa*'yı, S: molekül ağırlıkları bilinen standart proteinler

3.6. Antibiyotik Duyarlılığı

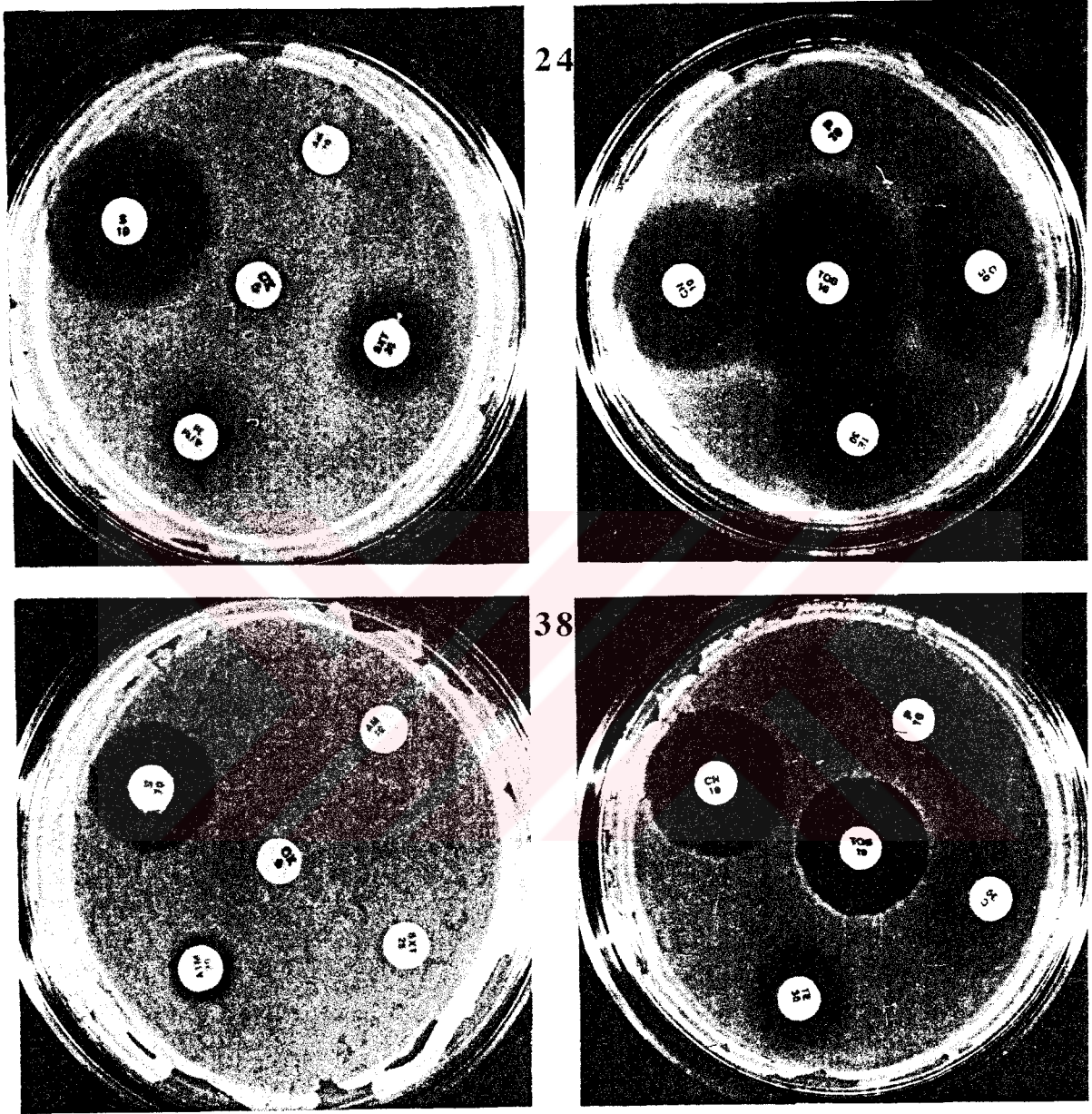
İzolatlar üzerine çeşitli antibiyotiklerin etkileri, oluşan inhibisyon bölgelerinin çapları ölçülerek tespit edildi. İnhibisyon bölgesi çap uzunlukları standart tablolardan karşılaştırılarak izolatların antibiyotiklere karşı dirençli veya duyarlı oldukları belirlendi. Çalışma sonunda izolatların hepsinin ampisilin, oksasilin ve penisilin G'ye karşı dirençli olduğu tespit edildi. Buna ilave olarak, 5 ve 38 numaralı izolatların kloramfenikol, tetrasiklin ve sülfametoksa'ya, 11 ve 21 numaralı izolatların sülfametoksa'ya ve 24 nolu izolatın da aztreonama'ya karşı dirençli olduğu tespit edildi (Şekil 5).



Şekil 5a. Çeşitli antibiyotiklerin izolatlar üzerindeki etkileri. 5: izolat numaraları, AM: ampisilin, ATM: aztreonama, CN: gentamisin, C: kloramfenikol, OX: oksasilin, P: penisilin G, S: streptomisin, SXT: sülfametoksa, TE: tetrasiklin, TOB: tobramisin



Şekil 5b. Çeşitli antibiyotiklerin izolatlar üzerindeki etkileri. 11 ve 21: izolat numaraları, AM: ampisilin, ATM: aztreonama, CN: gentamisin, C: kloramfenikol, OX: oksasilin, P: penisilin G, S: streptomisin, SXT: sülfametoksa, TE: tetrasiklin, TOB: tobramisin



Şekil 5c. Çeşitli antibiyotiklerin izolatlar üzerindeki etkileri.
 24 ve 38: izolat numaraları, AM: ampisilin, ATM: aztreonama, CN: gentamisin, C: kloramfenikol, OX: oksasilin, P: penisilin G, S: streptomisin, SXT: sülfametoksa, TE: tetrasiklin, TOB: tobramisin

4. TARTIŞMA

Çevre sorunu dünyanın pek çok yerinde özellikle son 20 yılda güncel hayata girmiş, acil çözüm bekleyen büyük bir problemdir. Hızlı sanayileşme ve endüstriyel gelişmeyle birlikte, petrol ve petrol türevi olan polisiklik aromatik hidrokarbon (PAH)'ların çevreye bulaşmaları, yeni ve çok tehlikeli bir çevre sorununu ortaya çıkarmıştır. Bu çevre sorununun çözümü çevresel dengenin yeniden sağlanması için temel şartı oluşturmaktadır.

Bu çalışmada öncelikle fuel oil bulaşmış ortamlardaki bakteri sayıları, örneklerin özelliklerine göre belirlendi. Bakteri sayısının en fazla yarı kuru toprakta, en az ise fuel oil bulaşmış ancak kurumuş ortamda olduğu tespit edildi.

Su, gelişmiş organizmalarda olduğu gibi bakterilerin de yaşamlarını devam ettirmeleri için gerekli şartlardan birini oluşturmaktadır. Bakterilerin besin almalarına ve bir yerden bir yere sürüklenmelerine yardım eder ve enzimatik reaksiyonların gerçekleşmesi için uygun ortamları oluştururken, bakteriler için gerekli iyon ve mineral maddelerin alınmasını da gerçekleştirir. Bunlara ilave olarak bakterilerin çoğalma hızlarına da katkıda bulunur. Ayrıca, bakteriler kuru ve hipertonic ortamlarda su kaybederek plazmolize uğrarlar. Bu durumun devamı bunların kısa bir süre sonra ölümlerine sebep olur. İhtiyaç duyulan su ve nem mevcut olduğundan, yarı kuru topraktaki bakteri sayısının fazla olması mevcut bilgilerle uyum içinde olan bir durumdur. Su miktarı çok fazla olunca, özellikle fuel oil ile birleştiği zaman oldukça yoğun bir balçık oluşturur. Bu da anaerobik bir ortamın oluşmasına sebep olur. Böyle ortamlarda daha çok bu özel duruma uyum sağlamış ve anaerobik veya fakültatif aerobik bakteriler yaşarlar. Bu durum da çeşitlilik az olduğu için bakteri sayısının düşmesine sebep olur. Su miktarının çok az olması nedeniyle kuru ortamdaki bakteri sayısının az olması da normal bir durumdur. Çalışma sonunda, çok az olsa da ortaya çıkan kuru topraklar (fuel oil bulaşmış ve kontrol) arasındaki bakteri sayısı farkı ise fuel oil bulaşmış ortama uyum sağlamış ilave türlerden ileri geldiği düşünülmektedir.

Her bakteri kendine has renk ve koloni morfolojisine sahiptir. Önce renklerine daha sonra da koloni morfolojilerine bakılarak (binoküler mikroskop altında) ayırım yapıldı. Triptik soy agarda büyüyen izolatların bu koloni özelliklerinden yararlanılarak yapılan ayırımıda, kontrol de dahil olmak üzere dört noktadan alınan örneklerde toplam 45 farklı izolat olduğu belirlendi.

Belirlenen toplam izolatlardan PAH'ların bulaştığı ortamlarda bulunan ve bu bileşikleri parçalayabilen (106) bakteriler arasında olduğu bilinen *Pseudomonas* cinsine dahil olan izolatlar "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology"de (107) belirtilen özelliklerden yararlanılarak belirlendi. Bilindiği gibi katalaz testi *Pseudomonas*'lar için devamlı pozitifdir. Ayrıca, bu cinse üyeleri aerobik şartlarda yaşarlar, flagella ile hareket ederler ve bazıları da pigment üretirler. Genellikle oksidaz pozitiflerdir. Bunlara ilave olarak *Pseudomonas* izolasyon agarda büyümeleri de izolatların bu cins girmelerini sağlayan özelliklerden biridir. *Pseudomonas* cinsine girdiği belirlenen 5 izolat (5, 11, 21, 24 ve 38 numaralı izolatlar)'ın çeşitli morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal karakterleri de "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology" ve çeşitli laboratuvar kitaplarındaki yöntemlere göre yapıldı (98, 107).

Çeşitli PAH'ların bakteriler tarafından parçalanmalarının biyokimyasal ve genetik olarak gerçekleştiği bilinmektedir (11-15). İzolatların PAH'ları parçalama testleri Joshi ve Walia (99) ve Kiyohara ve arkadaşları (100) tarafından kullanılan yöntemlerin birleştirilmesiyle gerçekleştirildi. Fenantren parçalama çalışmasında 30°C'de 2 gün inkübasyon sonunda 11, 21, 24 ve 38 numaralı izolatların ekim yapıldıkları nokta inokülasyonları etrafında şeffaf bölgeler oluşturdukları tespit edildi. Joshi ve Walia (99), bakterileri 30°C'de büyüttükten sonra üzerlerine fenantren püskürtmüş ve inkübasyona devam etmiştir. Bu inkübasyon sonunda kolonilerin etrafında bizim çalışmamızda bulduğumuz şeffaf bölgeleri görmüşlerdir. Kiyohara ve arkadaşları (100)'nın yaptığı çalışmada ise inokülasyon yapıldıktan hemen sonra Petrilere fenantren püskürtülmüş ve inkübasyondan sonra kolonilerin etrafında parlak bölgeler oluştuğu tespit edilmiştir. Çalışma sonunda, kısmen farklı stratejiler takip edilse bile, diğer benzer çalışmaların desteklediği gibi 11, 21, 24 ve 38 numaralı izolatların fenantreni parçaladığı tespit edildi.

Plazmidler, bakterilerde bulunan ve genomlarına dahil olmayan yuvarlak genetik elementlerdir. *Pseudomonas*'larda bulunan plazmidlerde kodlanmış enzimatik sistemler, birçok nadir bileşiği parçalama kapasitesine sahiptir (17-19). *Pseudomonas* cinsine giren izolatların plazmid içeriklerinin araştırılma çalışması sonucunda 11 ve 21 numaralı izolatlarda 2.7 kbp büyüklüğünde birer plazmid olduğu tespit edildi. Bu izolatlardaki PAH parçalama özelliği "plazmid curing" yapılarak test edilmiştir. Ancak, bu deney başarıyla sonuçlanmamış olmasına rağmen bu özelliğin plazmidten kaynaklandığı düşünülmektedir. Diğer fenantren parçalayıp da plazmide rastlanmayan izolatlar hakkındaki düşüncemiz ise varolabilecek bir plazmidin zamanla genome entegre olmuş olabileceğidir.

Cato ve arkadaşları (108), yaptıkları çalışmada aralarında %40 oranında DNA-DNA homolojisi olan aynı *Clostridium* türlerini suşlarının protein profili açısından çok bariz farklılıklara sahip olduğunu ve bu nedenle bunların farklı türler olabileceğini önerdiler. Cato ve arkadaşları, 70 adet *Clostridium* türünün suşları arasında suda çözünebilir proteinlerinin elektroforetik olarak karşılaştırılmasını esas alan bir araştırma sonucunda %80 DNA-DNA homolojisi gösteren suşların aynı protein bantlarına sahip olduklarını göstermişlerdir (108). Aralarında %70 DNA-DNA homolojisi olan suşların protein bantlarında ise çok küçük farklılıkların olduğu ortaya çıkarılırken, farklı türlerin ise birbirinden farklı protein bantlarına sahip oldukları belirlenmiştir (108). Bu çalışmalara benzer bir şekilde yaptığımız protein profillerinin karşılaştırılması çalışması sonucunda 5 izolatın da *P. aeruginosa*'ya benzerlik gösterdiği tespit edildi. İzolatlardan 5 ve 38 numaralı olanların ayrı birer tür, 11, 21 ve 24 numaralı olanların da 5 ve 38 numaralılarından farklı ancak, birbirleri arasında da ya aynı tür ya da birbirlerinin suşu olabileceği düşünülmektedir. Elde edilen protein profili sonuçları fizyolojik ve biyokimyasal sonuçları destekler niteliktedir.

İzolatlar üzerinde çeşitli antibiyotiklerin etkilerinin araştırılması için agar difüzyon metodu kullanıldı (104). Bilindiği gibi *Pseudomonas*'ların karbenisillin, kloramfenikol, gentamisin, kanamisin, streptomisin, tetrasiklin, tobramisin ve sulfonamid gibi antibiyotiklere dirençlilikleri, ihtiva ettikleri plazmidlerden kaynaklanır (107). Antibiyotikler bakteri, fungus ve aktinomisetler gibi çeşitli mikroorganizma türleri tarafından sentezlenen ve mikroorganizmaların

büyümelerini durduran veya onları öldüren maddelerdir. Bunlar, mikroorganizmaların farklı kısımlarını ve değişik şekillerde etkilerler. Ampisilin, oksasilin ve penisilin G, bakterilerin hücre çeperleri üzerinde etkili olan ve β -laktam halkaları ihtiva eden antibiyotiklerdir. Duvar yapısını bozarak bakterilerin ölümüne sebep olurlar. Bu antibiyotiklere dirençlilik β -laktamaz enzimi (özellikle gram-olumsuz basiller) üretilerek sağlanır. Bu enzim penisilin grubu ve sefalosporinlerin yapılarındaki β -laktam halkasını hidroliz eder ve böylece, antibiyotiği etkisiz hale getirir. *Pseudomonas*'lardaki β -laktamlara dirençlilik ise hem β -laktamaz üretimi hem de porin proteinlerindeki değişiklikler sayesinde olmaktadır (109). Bu özelliklerinden dolayı, izolatların hepsi ampisilin, oksasilin ve penisilin G'ye dirençlidir. Kloramfenikole dirençlilik, kloramfenikol asetil transferaz enzimi üretiminde meydana gelir. Enzim, kloramfenikolün hidroksil grubunu asetiller ve antimikrobiyal özelliğini bozar. Tetrasikline dirençlilik, hücre içine giren tetrasiklinin aktif transport yoluyla bakteri dışına çıkarılmasıyla gerçekleşir. Sülfametoksazol gibi bazı antibiyotiklerin hedefi bakteriyal enzimlerdir. Dirençli plazmidler biyokimyasal aktiviteleri farklı enzimler meydana getirirler. Özellikle tetrasiklin ve kloramfenikole dirençlilik yukarıda da belirtildiği gibi plazmidlerden kaynaklanır. Çeşitli antibiyotiklere duyarlılık çalışmalarıyla, PAH bulaşmış bir ortamdaki *Pseudomonas* türlerinin kullanılan antibiyotiklere dirençli olup olmadıklarının belirlenmesine katkıda bulundu.

Çalışma sonunda elde edilen tüm verilerin değerlendirilerek belirlenen izolatların tahmini tür ve alttür yorumları da şöyledir: İzolatların 2 tanesinin (11 ve 21) morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal özelliklerinin ve protein profillerinin birbirine çok yakın olması nedeniyle aynı tür veya biribirinin suşu ve 24 nolu izolatın da bunlara yakınlığından dolayı yine bunların bir suşu olabileceği düşünülmektedir. Buna ilave olarak 5 ve 38 numaralı izolatların ise hem birbirlerinden hem de diğer izolatlardan farklı birer tür oldukları tespit edilmiştir. Sonuçların değerlendirilmesi ve kurulan ilişkiler doğrultusunda 5 numaralı izolatın muhtemelen *Pseudomonas carboxydoflava* veya suşu, 11, 21 ve 24 nolu izolatların *Pseudomonas pseudoflava* veya suşları ve 38 nolu izolatında *Pseudomonas doudoroffii* veya suşu olabileceği tahmin edilmektedir.

5. SONUÇLAR

1. Alınan toprak örneklerinin bakteri sayıları, kuru toprakta 3.08×10^4 bakteri / g, yarı kuru toprakta 7.6×10^5 bakteri / g, çamurlu toprakta 1.28×10^5 bakteri / g ve kontrolde 2.6×10^4 bakteri / g olarak bulundu.

2. Örneklerin alındığı dört ayrı noktada toplam 45 farklı bakteriyal izolat olduğu tespit edildi.

3. Elde edilen 45 bakteriyal izolatın 5 tanesinin (5, 11, 21, 24 ve 38 numaralı izolatlar) *Pseudomonas* cinsine dahil olduğu belirlendi.

4. *Pseudomonas* cinsine dahil olan izolatların 4 tanesinin (11, 21, 24 ve 38 numaralı izolatlar) polisiklik aromatik hidrokarbonları parçaladığı tespit edildi.

5. İzolatların hem *Pseudomonas* cinsine dahil olanları hem de polisiklik aromatik hidrokarbonları parçalayanların 2 tanesinin (11 ve 21 nolu izolatlar) 2.7 kbp büyüklüğünde birer plazmid ihtiva ettiği belirlendi.

6. İzolatların 2 tanesinin (11 ve 21 numaralı izolatlar) morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal özelliklerinin ve protein profillerinin birbirine çok yakın olması nedeniyle aynı tür veya aynı türün farklı iki suşu oldukları ve 24 nolu izolatın da yakınlığından dolayı yine bunların bir suşu olabileceği düşünülmektedir.

7. İzolatlardan 5 ve 38 numaralı olanların ise hem birbirlerinden hem de diğer izolatlardan farklı birer tür oldukları tespit edilmiştir.

8. İzolatların hepsinin ampisilin, oksasilin ve penisilin G'ye karşı dirençli oldukları buna ilave olarak, 5 ve 38 numaralı izolatların kloramfenikol, tetrasiklin ve sülfemetoksa'ya, 11 ve 21 numaralı izolatların sülfemetoksa'ya ve 24 nolu izolatın da aztreonama'ya karşı dirençli oldukları tespit edildi.

9. Elde edilen sonuçların değerlendirilmesiyle, 5 numaralı izolatın muhtemelen *Pseudomonas carboxydoflava* veya suşu, 11, 21 ve 24 nolu izolatların *Pseudomonas pseudoflava* veya suşları ve 38 nolu izolatın da *Pseudomonas doudoroffii* veya suşu olabileceği tahmin edilmektedir.

6. ÖNERİLER

Polisiklik aromatik hidrokarbon (PAH) ile kirlenmiş ortamlardan izole edilecek PAH parçalayan bakterilerin, hidrokarbon bulaşmış ortamlara ekilmeleri, ekosistem dengelerinin yeniden kurulmasına büyük katkılar sağlayacaktır.

PAH parçalayan plazmid veya gen fragmentlerinin, PAH parçalama özelliği olmayan bakterilere transferi, çevrenin daha kısa sürede temizlenmesi için, yeni çevreci fenotipik karakterlere sahip suşların ortaya çıkmasına katkıda bulunacaktır.



7. KAYNAKLAR

1. Means, J. C., J. J. Hasett, S. G. Wood ve W. L. Banwart, Sorption Properties of Polynuclear Aromatic Hydrocarbons by Sediments and Soils, Environ. Sci.Technol., 14 (1980) 1524-1528.
2. LaFlamme, R. E. ve R. A. Hites, The Global Distribution of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, Geochim. Cosmochim. Acta, 42 (1984) 289-303.
3. Shiaris, M. P. ve D. Jambard-Sweet, Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Surficial Sediments of Boston Harbour, Massachusetts, USA. Mar. Pollut. Bull., 17 (1986) 469-472.
4. Youngblood, M. W. ve M. Blumer, Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the Environment: Homologous Series in Soils and Recent Marine Sediments, Geochim. Cosmochim. Acta, 39 (1975) 1303-1314.
5. Baker, J. M. (ed.), Marine Ecology and Oil Pollution, John Wiley & Sons, Inc., New York, 1976.
6. Wolfe, D. E. (ed.), Fates and Effects of Petroleum Hydrocarbons in Marine Organism and Ecosystems. Pergamon Press, Inc., Elmsford, New York, 1977.
7. Oil in the Sea-inputs, Fates, and Effects. National Academy of Sciences, National Academy Press, Washington, D. C., 1985.
8. Gibson, D. T., Microbial Degradation of Aromatic Compounds, Science, 161 (1968) 1093-1097.
9. Cerniglia, C. E, Aromatic Hydrocarbons: Metabolism by Bacteria, Fungi, and Algae, *In* E. Hodgson, J. R. Bend, and R. M. Philpot (ed.), Reviews in Biochemical Toxicology, Elsevier/North Holland Publishing Co., New York, 1981.
10. Cerniglia, C. E., Microbial Transformation of Aromatic Hydrocarbons, *In* R. M. Atlas (ed.), Petroleum Microbiology. Macmillan Publishing Co., New York, 1984.

11. Williams, P. A. ve K. Murray, Metabolism of Benzoate and the Methylbenzoate by *Pseudomonas putida* (arvilla) mt-2: Evidence for the Existence of a TOL Plasmid, J. Bacteriol., 127 (1974) 1217-1224.
12. Yano, K. ve T. Nishi, pKJ1, a Naturally Occurring Conjugative Plasmid Coding for Toluene Degradation and Resistance to Streptomycin and Sulfonate, J. Bacteriol., 145 (1980) 552-560.
13. Feriello, D. A., J. R. Mylroie, D. T. Gibson, J. E. Rogers, ve A. M. Chakrabarty, XYL, a Nonconjugative Xylene-degradative Plasmid in *Pseudomonas Pxy*, J. Bacteriol., 127 (1976) 1217-1224.
14. Kanemitsu, H., M. Fukuda ve K. Yano, Plasmid-borne Biodegradation of Toluene and Ethylbenzene in a Pseudomonad, J. Ferment. Technol., 58 (1980) 175-181.
15. Bailey, N. J. L., A. M. Jobson ve M. A. Rogers, Bacterial Degradation of Crude Oil: Comparison of Field and Experimental Data. Chem. Geol., 11 (1973) 203-221.
16. Davies, J. I. ve W. C. Evans, Oxidation Metabolism of Naphthalene by Soil Pseudomonad: The Ring-fission Mechanism, J. Biochem., 91 (1964) 251-261.
17. Jerina, D. M., H. Selander, H. Yagi, M. C. Wells, J. F. Davey, V. Mahadevan ve D. T. Gibson, Dihydrodiols from Anthracene and Phenanthrene, J. Am. Chem. Soc., 98 (1976) 5988-5996.
18. Evans, W. C., H. N. Fernley ve E. Griffiths, Oxidation Metabolism of Phenanthrene and Anthracene by Soil Pseudomonad, J. Biochem., 95 (1965) 819-831.
19. Kiyohara, H., K. Nagao ve R. Nomi, Degradation of Phenanthrene Through *o*-phthalate by an *Aeromonas* sp., Agric. Biol. Chem., 40 (1976) 1075-1081.
20. Shiaris, M. P., Seasonal Biotransformation of Naphthlene, Phenanthrene, and Benzo[a]pyrene in Surficial Estuarine Sediments, Appl. and Environ., 55 (1989) 1391-1899.

21. Leahy, J. G. ve R. R. Colvell, Microbial Degradation of Hydrocarbons in the Environment, Microbiol. Rev., 54 (1990) 305-315.
22. Hagar, R., Huge Cargo of North Slope Oil Spilled, J. Oil Gas, 87 (1989) 26-27.
23. Anonymous, Mishaps Cause Three Oil Spill off U.S., J. Oil Gas, 87 (1989) 22.
24. Göksu, E., Petrol Geolojisi, İstanbul Teknik Üniversitesi Matbaası, Gümüşsuyu, İstanbul, 1977.
25. Floodgate, G., The Fate of Petroleum in Marine Ecosystems, *In* R. M. Atlas (ed.), Petroleum Microbiology, Macmillan Publishing Co., New York, 1984.
26. Bossert, I. ve R. Bartha, The Fate of Petroleum in Soil Ecosystems. *In* R. M. Atlas (ed.), Petroleum Microbiology, Macmillan Publishing Co., New York, 1984.
27. Austin, B., J. J. Calomiris, J. D. Walker ve R. R. Colwell, Numerical taxonomy and ecology of petroleum-degrading bacteria, Appl. Environ. Microbiol., 34 (1977) 60-68.
28. Kirk, P. W. ve A. S. Gordon, Hydrocarbon Degradation by Filamentous Marine Higher Fungi, Mycology, 80 (1988) 776-782.
29. Ahearn, D. G. ve S. P. Meyers, The Role of Fungi in the Decomposition of Hydrocarbons in the Marine Environment, *In* A. H. Walters and E. H. Hueck-van der Plas (ed.), Biodeterioration of materials. John Wiley & Sons, Inc. New York, 1972.
30. Ahearn, D. G., F. Roth ve S. P. Meyers, Ecology and Characterization of Yeast from Aquatic Regions of South Florida, Mar. Biol., New York, 1 (1968) 291-308.
31. Pugh, G. J. F., Fungi in Intertidal Regions. Veroeff. Inst. Meeresforsch., Bremerhaven Suppl., 5 (1974) 403-418.

32. Ahearn, D. G. ve S. A. Crow, Fungi and Hydrocarbons in the Marine Environment, *In* S. T. Moss (ed.), *The Biology of Marine Fungi*, Cambridge University Press, Cambridge, 1986.
33. Valker, J. D. ve R.R. Colwell, Microbial Degradation of Model Petroleum at Low Temperatures, *Microb. Ecol.*, 1 (1974) 63-95.
34. Cooney, J. J. ve R. J. Summers, Hydrocarbon-using Microorganisms in Three Fresh-water Ecosystems, *In* J. M. Sharpley and A. M. Kaplan (ed.), *Proceeding of the 3rd International Biodegradation Symposium*, Appl. Science Publishers Ltd., London, 1976.
35. Song, H. G., T. A. Pedersen ve R. Bartha, Hydrocarbon Mineralization in Soil: Relative Bacterial and Fungal Contribution, *Soil. Biol. Biochem.*, 18 (1986) 109-111.
36. Valker, J. D., R.R. Colwell, Z. Vaituzis ve S. A. Meyers, Petroleum-degrading Achlorophyllous Alga *Prototheca zopfii*, *Nature* (London), 254 (1975) 423-424.
37. Cerniglia, C. E., D. T. Gibson ve C. van Baalen, Oxidation of Naphthalene by Cyanobacteria and Microalgae, *J. Gen. Microbiol.*, 116 (1980) 495-500.
38. Rogerson, A. ve J. Berger, Effect of Crude Oil and Petroleum-degrading Microorganisms on the Growth of Fresh-water and Soil Protozoa, *J. Gen. Microbiol.*, 124 (1981) 53-59.
39. Atlas, R. M.. Microbial Degradation of Petroleum Hydrocarbons: An Environmental Perspective, *Microbiol. Rev.*, 45 (1981) 180-209.
40. Cooney, J. J., The Fate of Petroleum Pollutants in Fresh-water Ecosystems. *In* R. M. Atlas (ed.), *Petroleum Microbiology*, Macmillan Publishing Co., New York, 1983.
41. Sayler, G. S., M. S. Shields, E. T. Tedford, A. Breen, S.W. Hooper, K. M. Sirotkin ve J. W. Davis, Application of DNA-DNA Colony Hybridization to the Detection of Catabolic Genotypes in Environmental Samples, *Appl. Environ. Microbiol.* 49 (1985) 1295-1303.

42. Roszak, B. D. ve R. R. Colwell, Survival Strategies of Bacteria in the Natural Environment, Microbiol. Rev., 51 (1987) 365-379.
43. Holben, W. E., J. K. Jansson, B. K. Chelm ve J. M. Tiedje, DNA Probe Method for the Detection of Specific Microorganisms in the Soil Bacterial Community, Appl. Environ. Microbiol., 54 (1988) 703-711.
44. Ogram, A., G. S. Sayler ve T. Barkay, The Extraction and Purification of Microbial DNA from Sediments, J. Microbiol. Methods, 7 (1987) 57-66.
45. Trevors, J. T., DNA Probes for the Detection of Specific Genes in Bacteria Isolated from the Environment, Trends Biotechnol., 3 (1985) 291-293.
46. Hada, H. S. ve R. K. Sizemore, Incidence of Plasmids in Marine *Vibrio* spp. Isolated from an Oil Field in the North-Western Gulf of Mexico, Appl. Environ. Microbiol., 41 (1981) 199-202.
47. Leahy, J. G., C. C. Somerville, K. A. Cunningham, G. A. Adamantiades, J. J. Byrd ve R. R. Colwell, Hydrocarbon Mineralization in Sediments and Plasmid Incidence in Sediment Bacteria from the Campeche Bank, Appl. Environ. Microbiol., 56 (1990) 1565-1570.
48. Burton, N. F., M. J. Day ve A. T. Bull, Distribution of Bacterial Plasmids in Clean and Polluted Sites in a South Wales River, Appl. Environ. Microbiol., 44 (1982) 1026-1029.
49. Ogunseitan, O. A., E. T. Tedford, D. Pacia, K. M. Sirotkin ve G. S. Sayler, Distribution of Plasmids in Groundwater Bacteria, J. Ind. Microbiol., 1 (1987) 311-317.
50. Fredrickson, J. K., R. J. Hicks, S. W. Li ve F. J. Brockman, Plasmid Incidence in Bacteria from Deep Subsurface Sediments, Appl. Environ. Microbiol., 54 (1988) 2916-2923.
51. Schutt, C., Plasmids in the Bacterial Assemblage of a Dystrophic Lake: Evidence for Plasmid-encoded Nickel Resistance, Microb. Ecol., 17 (1989) 49-62.

52. Brock, T.D. ve M.T. Madigan, *Biology of Microorganisms*, Prentice Hall, New Jersey, 1988.
53. Holt, J.G., N.R. Krieg, P.H. Sneath, J.T. Staley ve S. T. Williams, *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, Ninth Edition, Williams and Wilkins, 428 East Proston Street, Baltimore, D. M., 21202 U.S.A., 1994.
54. Sneath, A.P., *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Volume 2, Sneath, A.P., Mair, N.S., Sharpe, M.S. ve Holt, J.G., Williams and Wilkins, 428 East Proston Street, Baltimore, D. M., 21202 U.S.A., 1986.
55. Kluyver, A. J. ve C. B. van Niel, Prospects for a Natural System of Classification of Bacteria, Zentrabl. Bakteriол. Parasidenkd. Infektionskr. Hyg. Abt. II, 99 (1936) 369-403.
56. Palleroni, N. J., R. Kunisawa, R. Contopoulou ve M. Doudoroff, Nucleic Acid Homologies in the Genus *Pseudomonas*, Int. J. Syst. Bacteriol., 23 (1973) 333-339.
57. Swings, J. M. Gillis, K. Kersters, P. De Vos, F. Gosselé and J. De Ley, *Frateria*, a New for "*Acetobacter aurantius*", Int. J. Syst. Bacteriol., 30 (1980) 547-556.
58. Palleroni, N. J., Introduction to the Family *Pseudomonaceae*, In Starr, Stolp, Trüper, Balows and Schlegel (Editors), *The Prokaryotes, A Handbook on Habitats, Isolation and Identification of Bacteria*, Springer-Verlag, Berlin, 1981.
59. De Smedt, J, M. Bauwens, R. Tijtgat ve J. De Ley, Intra-genetic Similarities of Ribosomal Ribonucleic Acid Cistrons of Free-living, Nitrogen-fixing Bacteria, Int. J. Syst. Bacteriol., 27 (1980) 222-240.
60. Schroeter, J., Ueber Einige Durch Bacterien Gebildete Pigmente, In, F. Cohn (1875) *Beiträge Zür Biologie Der Pflanzen*, J.U. Kern's Verlag, Breslau, 1872.
61. Ballard R. W., M. Doudoroff, R. Y. Stanier ve M. Mandel, Taxonomy of the Aerobic *Pseudomonas*: *Pseudomonas diminuta* and *P. vesiculare*, J. Gen. Microbiol., 53 (1968) 349-361.

62. Gilleland, H. E., J. D. Stinnett, I. L. Roth ve R. G. Eagon, Freeze-etch Study of *Pseudomonas aeruginosa*: Localization Within the Cell Wall of an Ethylenediaminetetraacetate-extractable Component, J. Bacteriol., 113 (1973) 417-432.
63. Hancock, R. E. W. ve H. Nikoïda, Outer Membranes of Gram-negative Bacteria, XIX, Isolation from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 and Use in Reconstitution and Definition of the Permeability Barrier, J. Bacteriol., 136 (1978) 381-390.
64. Hoffman, H.P., S. C. Geftic, H. Heymann ve F. W. Adair, Mesosomes in *Pseudomonas aeruginosa*, J. Bacteriol., 114 (1973) 434-438.
65. Yamamoto, T., Presence of Rhabidosome in Various Species of Bacteria and Their Morphological Characteristics, J. Bacteriol., 94 (1967) 1746-1756.
66. Amako, K., K. Yamusaka ve K. Takeya, Relationship Between Rhabidosome and Pyocin in *Pseudomonas fluorescens*, J. Gen. Microbiol., 62 (1970) 107-112.
67. Baechler, C. A. ve R. S. Berk, Ultrastructural Observation of *Pseudomonas aeruginosa*: Rhabidosomes, Microstructures, 3 (1972) 24-28.
68. Meyer, J. M., Pigment Fluorescent et Métabolisme du Fer Chez *Pseudomonas fluorescens*, Thèse d'Etat, Strasbourg, 1977.
69. Meyer, J. M. ve M. A. Abdallah, The Fluorescent Pigment of *Pseudomonas fluorescens*: Biosynthesis, Purification and Physico-chemical Properties, J. Gen. Microbiol., 107 (1978) 319-328.
70. Meyer, J. M. ve J. M. Hornsperger, Role of Pyoverdinep_f, the Iron-binding Fluorescent Pigment of *Pseudomonas fluorescens*, in Iron Transport, J. Gen. Microbiol., 107 (1978) 329-331.
71. Morris, B. M. ve J. B. Roberts, A Group of Pseudomonads Able to Synthesize Poly-beta-hydroxybutyric Acid, Nature, 183 (1959) 1538-1539.

72. Sneath, P. H. A., A Study of the Bacterial Genus *Chromobacterium*, Iowa. St. J. Sci., 34 (1960) 243-500.
73. Gray, P. H. H., The Formation of Indigotin from Indole by Soil Bacteria, Proc. Roy. Soc., B, 102 (1928) 263-280.
74. Jacoby, G. A., Plasmids of *Pseudomonas aeruginos*. In Doggett (Editor), *Pseudomonas aeruginosa*, Clinical manifestations Ofinfection and Current Therapy, Academic Press, New York, 1979.
75. Jacoby, G. A. ve J. A. Shapiro, Plasmids Studied in *Pseudomonas aeruginos* and Other Pseudomonads. In Bukhari, Shapiro and Adhya (Editor), DNA Insertion Elements, Plasmids and Episomes, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 1977.
76. Korfhagen, T. R., L. Sutton ve G. A. Jacoby, Classification and Physical Properties of *Pseudomonas* Plasmids. In Schlessinger (Editor) "Microbiology-1978", Ameican Society for Microbiology, Washington, D.C., 1978.
77. Chakrabarty, A. M., Microorganisms Having Multiple Compatible Degradative Energy-generating Plasmids and Preparation Thereof, U. S. Patent 4, 1981.
78. Bryan, L. E., Resistance to Antimicrobial Agents: The General Nature of the Problem and the Basis of Resistance. In Doggett (Editor) *Pseudomonas aeruginosa*, Clinical Manifestations of Infection and Current Therapy, Academic Press, New York, 1979.
79. Palleroni, N. J., Isolation and Properties of a New Hydrogen Bacterium Related to *Pseudomonas saccharophila*, J. Gen. Microbiol., 117 (1980) 155-161.
80. Gaman, W., C. Cates, C. F. T. Snelling, B. Lank ve A. R. Ronald, Emergence of Gentamicin- and Carbenicillin-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in a Hospital Environment, Antimicrob. Agents Chemother., 9 (1976) 474-480.
81. Lowbury, E. J. L., H. A. Lilly, A. Kidson, G. A. J. Ayliffe ve R. J. Jones, Sensitivity of *Pseudomonas aeruginosa* to Antibiotics: Emergence of Strains Highly Resistant to Carbenicillin, Lancet, 1969 (1969) 448-452.

82. Sykey, R. B. ve M. H. Richmond, Intergenetic Transfer of a Beta-lactamase Gene Between *Ps. aeruginosa* and *E. coli*, Nature, 226 (1970) 952-954.
83. Jacoby, G. A. ve M. Matthew, The Distribution of Beta-lactamase Genes on Plasmids Found in *Pseudomonas*, Plasmid, 2 (1979) 41-47.
84. Zimmermann, W., 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 (1980) 94-100.
85. Johnsen, J., Utilization of Benzylpenicillin as Carbon, Nitrogen and Energy Source by a *Pseudomonas fluorescens* strain, Arch. Microbiol., 115 (1977) 271-275.
86. Beckman, W. ve T. G. Lessie, Response of *Pseudomonas cepacia* to Beta-lactam Antibiotics: Utilization of Penicillin G as Carbon Source, J. Bacteriol., 140 (1980) 1126-1128.
87. Garrod, L. P. ve M. P. Waterworth, Effect of Medium Composition on the Apparent Sensitivity of *Pseudomonas aeruginosa* to Gentamicin, J. Clin. Pathol., 22 (1969) 534-538.
88. Summers, A. O., G. A. Jacoby, M. N. Swartz, G. McHugh ve L. Sutton, Metal Cations and Oxyanion Resistances in Plasmids of Gram-negative Bacteria, *In* Schlessinger (Editor), "Microbiology-1978", American Society for Microbiology, Washington D. C., 1978.
89. Stanier, R. Y., N. J. Palleroni ve M. Doudoroff, The Aerobic Pseudomonads: A Taxonomic Study, J. Gen. Microbiol., 43 (1966) 159-271.
90. Palleroni, N. J. ve M. Doudoroff, Some Properties and Taxonomic Subdivisions of the Genus *Pseudomonas*, Annu. Rev. Phytopathol., 10 (1972) 73-100.
91. King, E. O., W. K. Ward ve D. E. Raney, Two Simple Media for the Demonstration of Pyocyanin and Fleurescein, J. Lab. Clin. Med., 44 (1954) 301-307.

92. Sommer, E. C., W. S. Silver ve L. C. Vining, Studies of pigmentation by *Pseudomonas indigofera*, Can. J. Microbiol., 5 (1961) 577-585.
93. Delafield, F. P., M. Doudoroff, N. J. Palleroni, C. J. Lusty ve R. Contopoulos, Decomposition of Poly- β -hydroxybutyrate by Pseudomonads, J. Bacteriol., 90 (1965) 1455-1466.
94. Thornley, M. J., The Differentiation of *Pseudomonas* from Other Gram-negative Bacteria on the Basis of Arginine Metabolism, J. Appl. Bacteriol., 23 (1960) 37-52.
95. Hugh, R. ve E. Leifson, The Taxonomic Significance of Fermentative Versus Oxidative Metabolism of Carbohydrates by Various Gram-negative Bacteria, J. Bacteriol., 66 (1953) 24-26.
96. Sierra, G., A Simple Method for Detection of Lypolytic Activity of Microorganisms and some Observations on the Influence of the Contact Between Cells and Fatty Substrates, Antonie van Leeuwenhoek, J. Microbiol. Serol., 23 (1957) 15-22.
97. Benson, H.J., Microbiological Applications, a Laboratory Manual in General Microbiology, Fourth Edition, Wm C. Brown Publishers. Dubuque, Iowa, 1985.
98. Cappuccino, J.G. ve Sherman, N., Microbiology a Laboratory Manual, Third Edition, Rockland Community College, Suffern, New York, 1992.
99. Joshi, B. ve S. Walia, PCR Amplification of Catechol 2,3-Dioxygenase Gene Sequences from Naturally Occurring Hydrocarbon Degrading Bacteria Isolated from Petroleum Hydrocarbon Contaminated Groundwater, FEMS Microbiol. Ecol., 19 (1996) 5-15.
100. Kiyohara, H., K. Nagao ve K. Yana, Rapid Screen for Bacteria Degrading Water-insoluble, Solid Hydrocarbons on Plates, Appl. Environ. Microbiol., 43 (1982) 454-457.
101. Voskuil, M.I. ve Chambbiss, G.H., Rapid Isolation and Sequencing of Purified Plasmid DNA from *Bacillus subtilis*, Appl. and Environ. Microbiol., 59, 4 (1993) 1138-1142.

102. Bradford, M.M, A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilising the Principle of Protein-dye Binding. Anal. Biochem., 72 (1976) 248-254.
103. Laemmli, U. K., Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4, Nature, 227 (1970) 680-685.
104. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Approved Standard: Second Informational Supplement: M100-S2. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Testing, NCCLS, Villanova, Pa., (1987).
105. David, A.P. ve P.J. Mccuen, Manual of BBL Products and Laboratory Procedures, Sixth Edition, U.S.A., 67-72, 1988.
106. Ashok, B.T., S. Saxena ve J. Musarrat, Isolation and Characterization of Four Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Degrading Bacteria from Soil Near an Oil Refinery, Lett. Appl. Microbiol., 21 (1995) 246-248.
107. Krieg, N.R. ve J.G. Holt, Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Volume 1, R.G.E. Murray (Chairman), D.J. Brenner, M.P. Bryant, J.G. Holt (Editor), N.R. Krieg, J.W. Moulder, N. Pfennig, P.H.A. Sneath and J.T. Staley. Williams&Wilkins, 428 East Preston Street, Baltimore, H.D., 21202, U.S.A., 1984.
108. Cato, E.P., Hash, D.E., Holdeman,L.V. ve Moore, W.E.C., Electroforetic Study of *Clostridium* Species, J. Clin. Microbiol., 15 (1982) 688-702.
109. Kılıçturgay, K., F. Gökırmak, O. Türe, S. Gedikoğlu, G. Güral ve S. Helvacı, Temel Mikrobiyoloji ve Parazitoloji, K. Kılıçturgay (Editör), Güneş&Nobel Tıp Kitabevleri, Hünkar Ofset Matbaacılık, İstanbul, 1996.

8. EKLER

8.1. Besiyeri, Ayıraç ve Boyaların Hazırlanışı

8.1.1. Besiyerilerinin Hazırlanışı

Anaerobik Agar: Anaerobik agar hazırlamak için 20 g tripticase, 10 g glukoz, 5 g sodyum klorür, 15 g agar, 2 g sodyum tioglikolate ve 1 g sodyum formaldehit sulfoksilat 1000 ml dH₂O'da çözüldü, pH'ı 7.2'ye ayarlandıktan sonra ve otoklavlanarak steril edildi.

İndol Üretimi Besiyeri İndol üretiminin test edilmesi için %1'lik triptone broth veya %1'lik triptikase broth kullanıldı. Besiyeri hazırlandıktan sonra otoklavlanarak steril edildi.

Karbohidrat Fermentasyonu Besiyeri: Bu besiyerinin hazırlanması için ilk olarak temel besiyeri hazırlandı. Bu nedenle, 1 g diamonyum hidrojen fosfat, 0.2 g potasyum klorür, 0.2 g magnezyum sülfat, 0.2 g maya ekstraktı ve 15 g agar 1000 ml dH₂O'da çözüldü, pH'ı 7.0'a ayarlanmadan önce %0.04 (w/v) oranında hazırlanan bromcresol purple solusyonundan 15 ml ilave edildi ve otoklavlanarak steril edildi.

Fermentasyon özelliklerine bakılacak olan şekerlerin hazırlanması için %10 oranındaki karbohidrat solüsyonları hazırlandı ve karışım filtreden geçirilmek suretiyle steril edildi. Daha sonra 50°C'ye kadar soğutulan steril temel besiyerine %0.5 olacak şekilde karbohidrat solüsyonundan ilave edildi ve besiyerleri slant olarak kullanıldı.

Nişasta Agar: Besiyerinin hazırlanması için 1 g patates nişastası 10 ml soğuk dH₂O'da çözüldükten sonra 100 ml nütrient agarla karıştırıldı ve otoklavlanarak steril edildi.

Nitrat Broth: Nitrat broth hazırlamak için 5 g pepton, 3 g sığır ekstraktı ve 1 g potasyum nitrat 1000 ml dH₂O'da çözülüp, pH 7.0'a ayarlandı ve otoklavlanarak steril edildi.

Nütrient Agar: Nütreint agar hazırlamak için 5 g pepton, 3 g sığır ekstraktı ve 15 g agar 1000 ml dH₂O'da çözüldü ve otoklavlanarak steril edildi. Çalışmada, ticari olarak satılan nütrient agar da kullanıldı.

Nütrient Broth: Besiyerinin hazırlanması için 3 g sığır ekstraktı ve 5 g pepton 1000 ml dH₂O'da çözüldü ve pH'ı 6.8'e ayarlandı. Otoklavda 121°C 'de 20 dakika bekletilerek steril edildi. Ayrıca, çalışmada ticari olarak satılan nütrient broth'ta kullanıldı.

Nütrient Jelatin: Ticari olarak satılan nütrient jelatinden 120 g alınıp, 1000 ml dH₂O'da çözüldü, pH'ı 7.0'a ayarlandı ve otoklavlanarak steril edilip, kullanıldı. Aynı işlem için %0.4 oranında jelatin ihtiva eden nütrient agar da kullanılabilir.

Sitrat ve Propionat Kullanım Besiyerileri: Besiyerilerin hazırlanması için 1 g trisodyum sitrat 2H₂O (veya 2 g sodyum propionat), 1.2 g magnezyum sulfat 7H₂O, 0.5 g diamonyum hidrojen fosfat, 1 g potasyum klorür, 40 ml eser element solüsyonu, 15 g agar, 920 ml dH₂O ve 20 ml %0,04'lük fenol kırmızısı solüsyonu karıştırıldı, pH'ı 6.8'e ayarlandı ve otoklavlanarak steril edildi.

Eser element solüsyonun hazırlama: Solüsyon, 50 mg etilendiamintetraasetat, 200 mg FeSO₄.7H₂O, 10 mg ZnSO₄, 3 mg MnCl₂.4H₂O, 30 mg H₃BO₃, 20 mg CoCl₂.6H₂O, 1mg CuCl₂.2H₂O, 2 mg NiCl₂.6H₂O ve 3 mg NaMoO₄.2H₂O, 1000 ml dH₂O'da çözülerek hazırlandı.

Üre Hidrolizi Besiyeri: Üre besiyeri hazırlamak için 0.1 g maya ekstraktı, 9.1 g potasyum fosfat monobazik, 9.5 g potasyum fosfat dibazik, 0.2 g üre ve 0.001 g fenol kırmızısı karışımına 117 ml dH₂O ilave edildi, pH'ı 6.8'e ayarlandıktan sonra 0.45 µm gözenek büyüklüğüne sahip steril filtreden geçirilmek suretiyle steril edildi.

Voges-Proskauer Broth: Besiyeri hazırlamak için 7 g pepton, 5 g glukoz ve 5 g sodyum klorür, 1000 ml dH₂O'da çözüldü. Karışımın pH'ı 6.5'e ayarlandıktan sonra otoklavlanarak steril edildi.

8.1.2. Ayıraçlar ve Boyaların Hazırlanışı

Aseton Alkol: Karışım, 250 ml %95'lik etanol ve 250 ml saf aseton karıştırılarak hazırlandı.

Jelatin Hidrolizi Ayıraç: Ayıraç, 1 N H₂SO₄, sodyum sülfat (Na₂SO₄) ile doyurularak hazırlandı.

İyot Çözeltisi Çözelti, 1 g iyot, 2 g potasyum iyodür, 60 ml %5'lik sodyum bikarbonat (NaHCO₃) ve 240 ml dH₂O karıştırılarak hazırlandı.

İndol Ayıraç Ayıraç, 5 g p-dimetilaminobenzaldehit, 75 ml izoamil alkol ve 25 ml konsantirik hidroklorik asit (HCl) karıştırılarak hazırlandı.

Lügol Ayıraç Lügol solüsyonu mikroorganizmanın nişastayı hidroliz edip etmediğinin belirlenmesi amacıyla kullanılır. Solüsyon, 1 g iyot, 2 g potasyum iyodür (KI), 60 ml %5'lik sodyum bikarbonat (NaHCO₃), 240 ml dH₂O ile karıştırılarak hazırlandı.

Katalaz Ayıraç Ayıraç olarak %10'luk hidrojen peroksit (H₂O₂) çözeltisi kullanıldı.

Kristal Viyole Boyası: Bu boya iki ayrı solüsyon halinde hazırlanıp, karıştırıldı. Solüsyon A, 1 g kristal viyole, 10 ml etanol ve 90 ml dH₂O, Solüsyon B, 4 g amonyum oksalat ve 400 ml dH₂O karıştırılarak hazırlandı. Sonra her iki solüsyon birbirine karıştırılarak kullanıldı.

Nitrit Ayıracı Bu ayıraç ortamdaki nitratın nitrite indirgenip indirgenmediğinin ortaya çıkarılması için kullanıldı. İki ayrı ayıraç olarak hazırlandı. Ayıraçlardan birincisi 1 N hidroklorik asid solüsyonudur. Kullanılan diğer ayıraç ise şu şekilde hazırlandı. Solüsyon A için, 8 g sulfonilik asit, 5 N asetik asit, Solüsyon B için ise 6 ml dimetil α -naftolamin ve 5 N asetik asit 1000 ml dH₂O'da çözüldü.

Safranin: Boya, 2.5 g safranin O, 100 ml %95'lik etanol ve 500 ml dH₂O karıştırılarak hazırlandı.

Voges-Proskauer Ayıracı Ayıraç, %40'luk sodyum hidroksit (NaOH) çözeltisinin 3 mililitresine 0.5-1 mg keratin ilave edilerek hazırlandı.

9. ÖZGEÇMİŞ

24.04.1972 tarihinde Trabzon'da doğdu. İlk öğrenimini Yalıncağ Köyü İlkokulunda, Orta öğrenimini Atatürk İlköğretim Okulunda bitirdi. Trabzon Lisesinden mezun olduktan sonra, 1990 yılında Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünde lisans öğrenimine başladı. Bu bölümden 1994 yılında üniversite birincisi olarak biyolog ünvanı ile mezun oldu. Aynı yıl bu bölümde hem Araştırma Görevlisi hem de yüksek lisans sınavlarını kazanarak araştırma görevliliğine ve yüksek öğrenimine başladı. Mikrobiyoloji ve moleküler biyoloji alanlarında dersler alarak çeşitli çalışmalar yaptı. Halen bu görevine devam etmektedir.